

JULIO CESAR FERNANDES

**INIBIÇÃO SIMULTÂNEA DE INTERLEUCINA-1 β , INTERLEUCINA-6,
FATOR DE NECROSE TUMORAL- α , PROSTAGLANDINA E₂ E
ESTROMELISINA. ESTUDO *IN VITRO* DE MEMBRANAS RETIRADAS
DE REVISÕES DE PRÓTESES TOTAIS DE QUADRIL COM OSTEOLISE**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção
do grau de Doutor. Curso de Pós-Graduação em
Clínica Cirúrgica, Setor de Ciências da Saúde,
Universidade Federal do Paraná. Orientador:

Prof. Dr. Luiz Antônio Munhoz da Cunha

Coordenador: Prof. Dr. Antonio Carlos L. Campos

CURITIBA

2002

FERNANDES, Julio Cesar

Inibição simultânea de interleucina-1 β , interleucina-6, fator de necrose tumoral- α , prostaglandina E2 e estromelisina. Estudo *in vitro* de membranas retiradas de revisões de próteses totais de quadril com osteólise. (Tese – Doutorado – Programa de Pós Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná)

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antônio Munhoz da Cunha

60 p. il.

1. Osteólise 2. Tenidap 3. Diclofenaco 4. Metaloproteinases 5. Citocinas 6. PGE2 7. Arthroplastia total de quadril 8. partículas

II. Título



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA
NÍVEL MESTRADO - DOUTORADO

DECLARAÇÃO

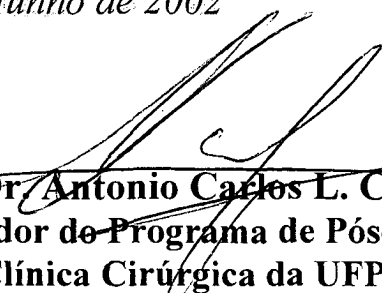
*Declaro, que o **Dr. JULIO CESAR FERNANDES**, completou os requisitos necessários para obtenção do Grau Acadêmico de Doutor em Clínica Cirúrgica ofertado pela Universidade Federal do Paraná.*

*Para obtê-los, concluiu os créditos didáticos previstos no Regimento do Programa e apresentou sua tese sob título: **“INIBIÇÃO SIMULTÂNEA DE INTERLEUCINA-1 β , INTERLEUCINA-6, FATOR DE NECROSE TUMORAL- α , PROSTAGLANDINA E2 E ESTREMELISINA. ESTUDO IN VITRO DE MEMBRANAS RETIRADAS DE REVISÕES DE PRÓTESES TOTAIS DE QUADRIL COM OSTEOLISE”**, em tempo hábil.*

A tese foi defendida nesta data e aprovada pela Comissão Examinadora composta pelos Professores Drs. Jean Alexandre Furtado Correa Francisco - Membro, Moth Domit Filho – Membro, Paulo Sérgio dos Santos – Membro, Gabriel Paulo Skroch – Membro, Gerson de Sá Tavares Filho - Presidente.

E, por ser verdade, firmo a presente.

Curitiba, 19 de junho de 2002


Prof. Dr. Antonio Carlos L. Campos
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Clínica Cirúrgica da UFPR

À minha pequena família: Josiane, Victor e Anna Luiza.

Aos meus pais.

Aos meus irmãos.

Aos meus amigos e colegas.

AGRADECIMENTOS

À minha pequena família: Josiane, Victor e Anna Luiza. Os anos passam e a alegria de vivermos juntos me contagia e me leva a me doar inteiramente para vocês para que a felicidade nunca nos abandone.

Aos meus pais, Dr. Álvaro Fernandes Sobrinho e Dona Benilde Buzarello Fernandes, que souberam me guiar no meu começo de vida. As fundações que vocês construíram foram sólidas para que a obra que se termina neste dia possa ficar para sempre.

Aos meus irmãos, Elizabeth e Carlos, e às suas famílias, que vejo todos os dias com os olhos do coração que a distância não consegue turvar.

Aos amigos do laboratório do Centro de Pesquisa do CHUM da Universidade de Montreal, aos amigos do Hospital Notre-Dame em Montreal e do Hospital de Clínicas em Curitiba, pois nunca se constrói sozinho uma obra sem o apoio silencioso daqueles que nos cercam.

SUMÁRIO

	LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	vii
	LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	viii
	RESUMO	x
	ABSTRACT	xi
1	INTRODUÇÃO	2
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	5
2.1	PERSPECTIVA HISTÓRICA DA SOLTURA DAS ATQ.....	5
2.2	APRESENTAÇÃO CLÍNICA DA OSTEOLISE ET DA SOLTURA DAS ATQ.....	6
2.3	MECANISMOS DE SOLTURA DAS ATQ.....	7
2.4	PROCESSOS ENZIMÁTICOS NA DEGRADAÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR.	9
2.5	TENIDAP.....	13
2.5.1	Estrutura e propriedades.....	13
2.5.2	Efeito sobre as oxigenases	14
2.5.3	Efeito sobre a Interleucina-1.....	15
2.5.4	Efeito sobre as MMP.....	15
3	MATERIAL E MÉTODO.....	17
3.1	CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DOS PACIENTES	17
3.2	CULTURA DOS EXPLANTES DE MEMBRANAS DA INTERFACE OSSO-IMPLANTE	20
3.3	ANÁLISE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS METALOPROTEASES.....	20
3.4	ANÁLISE DO NÍVEL DE NITRITOS	21
3.5	ANÁLISE DO NÍVEL DE CITOCINAS	22
3.6	ANÁLISE DA SÍNTESE DE PGE2	22

3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	22
4	RESULTADOS	24
4.1	PRODUÇÃO DOS DIFERENTES MEDIADORES DE INFLAMAÇÃO NOS EXPLANTES DE MEMBRANA	24
4.2	EFEITO DOS MEDICAMENTOS SOBRE A SÍNTESE DE CITOCINAS	24
4.2.1	Interleucina-1 β	24
4.2.2	Interleucina-6	25
4.2.3	TNF- α	26
4.2.4	Efeito dos medicamentos sobre a síntese de PGE2.....	27
4.2.5	Efeito dos medicamentos sobre a síntese de NO	28
4.2.6	Efeito dos medicamentos sobre a atividade das MMP.....	29
4.2.6.1	Colagenase-1	29
4.2.6.2	Estromelisina.....	29
5	DISCUSSÃO	32
5.1	PRODUÇÃO DE PARTÍCULAS CAUSADAS PELO DESGASTE DO IMPLANTE.....	32
5.2	RESPOSTA INFLAMATÓRIA ÀS PARTÍCULAS DE DESGASTE DOS COMPONENTES	34
5.3	ANÁLISE DA INTERAÇÃO PARTÍCULAS-MACRÓFAGOS	36
5.4	ANÁLISE DA INTERAÇÃO PARTÍCULAS-FIBROBLASTOS	38
5.5	TRATAMENTO DA OSTEOLISE NA ATQ	39
5.6	EFEITO DOS MEDICAMENTOS EXPERIMENTAIS NO PRESENTE ESTUDO	41
5.6.1	Efeito sobre as citocinas e prostaglandinas	41
5.6.2	Efeito dos medicamentos sobre o óxido nítrico	42
5.6.3	Efeito dos medicamentos sobre a atividade das MMP.....	43
6	CONCLUSÕES	46

REFERENCIAS	48
--------------------------	-----------

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	ASPECTO RADIOLÓGICO DE UMA LESÃO OSTEOLÍTICA MASSIVA EM UMA ARTROPLASTIA TOTAL DO QUADRIL SOLTA.	17
FIGURA 2	ASPECTO RADIOLÓGICO DE OSTEOLISE FEMORAL EM DUAS PRÓTESES DE PROCEDÊNCIA DIFERENTE. AMBAS AS HASTES SÃO NÃO CIMENTADAS.....	18
FIGURA 3	EFEITO IN VITRO DE TENIDAP E DICLOFENACO NOS NÍVEIS DE IL-1 β	25
FIGURA 4	EFEITO IN VITRO DE TENIDAP E DICLOFENACO NOS NÍVEIS DE IL-6.....	26
FIGURA 5	EFEITO IN VITRO DE TENIDAP E DICLOFENACO NOS NÍVEIS DE TNF- α	27
FIGURA 6	EFEITO IN VITRO DE TENIDAP E DICLOFENACO NOS NÍVEIS DE PEG2.....	28
FIGURA 7	EFEITO IN VITRO DE TENIDAP E DICLOFENACO NOS NÍVEIS DE NO.....	29
FIGURA 8	EFEITO IN VITRO DE TENIDAP E DICLOFENACO NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA ESTROMELISINA.....	30
FIGURA 9	FOTOMICROGRAFIA DE MEMBRANA DE INTERFACE RETIRADA DE PRÓTESE TOTAL DE QUADRIL SOLTA SEM CIMENTO (À ESQUERDA) E CIMENTADA (À DIREITA). NUMEROSAS PARTÍCULAS BIREFRINGENTES DE TAMANHO SUBMICRON, PROVAVELMENTE POLIETILENO, SÃO VISÍVEIS EM LUZ POLARIZADA (À ESQUERDA). NUMEROSAS PARTÍCULAS METÁLICAS ESCURAS INTRACELULARES SÃO BEM VISUALIZADAS À DIREITA (X50).....	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINS/NSAID	anti-inflamatório não esteróide
AMPc.....	AMP cíclico
AP-1.....	complexo heterodimérico <i>jun/fos</i>
ARNm.....	ácido ribonucleico mensageiro
ATQ	artroplastia total do quadril
COX-1	ciclooxigenase-1
COX-2	ciclooxigenase-2
DMEM.....	meio de cultura Dulbecco modificado por Eagle
GAG	glicosaminoglicanos
HA	ácido hialurônico
IC ₅₀	concentração de inibição à 50%
IGF-I.....	<i>insulin-like growth factor-I</i>
IL-1	interleucina-1
IL-1R	receptor de IL-1
IL-1ra.....	antagonista do receptor de IL-1
IL-6.....	interleucina-6
Kd	constante de dissociação
LCTB ₄	leucotrieno B ₄
LCTC ₄	leucotrieno C ₄
TBXA ₂	tromboxane A ₂
LPS	lipopolissacarídeos
MMP.....	metaloproteinases
MMP-1	colagenase fibroblástica
MMP-2	gelatinase 72 kDa
MMP-3	estromelina-1
MMP-7	matrilisina
MMP-8	colagenase neutrofílica
MMP-9	gelatinase 92 kDa
MMP-10	estromelina-2
NO	óxido nítrico
OA	artrose
PA	ativador do plasminogênio
PAI-1	inibidor do ativador do plasminogênio

PG.....	proteoglicane
PGE ₂	prostaglandina E ₂
PGF ₂	prostaglandina F ₂
PGI ₂	prostaglandina I ₂
PMMA.....	Polimetilmetacrilato
proMMP	prometaloproteinase
proIL-1	pro interleucina-1
PTFE.....	politetrafluoroetileno
RA.....	artrite reumatóide
rHuIL-1 β	interleucina-1 β recombinante humana
TIMP.....	inibidor tissular das metaloproteases
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
u-PA.....	ativador do plasminogênio uroquinase
UHMWPE	Polietileno de peso molecular ultra elevado
w.w.	<i>wet weight</i> (tecido a fresco)

RESUMO

Citocinas pró-inflamatórias e a prostaglandina E_2 têm uma função importante na fisiopatologia da osteólise e na soltura das próteses totais de quadril. A interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) são moduladores potentes de enzimas proteolíticas como as metaloproteinases e o óxido nítrico. Isso causa a remoção da matriz osteoide e expõe a superfície à sequestração osteoclastica do osso e a subsequente osteólise. O objetivo deste estudo foi de avaliar os níveis de citocinas e de PGE2 em resposta a agentes farmacológicos em explantes da membrana da interface osso-prótese em próteses totais do quadril soltas. Membranas retiradas quando da revisão de próteses totais do quadril foram colocadas em cultura ($n=20$), às quais acrescentou-se separadamente o medicamento experimental tenidap em quatro concentrações diferentes (0, 5, 20 ou 50 $\mu\text{g/ml}$), ou o anti-inflamatório diclofenaco a uma concentração de 125 $\mu\text{g/ml}$. Os níveis de IL-1 β , IL-6, TNF- α e PGE2 foram medidos no meio de cultura usando técnicas de ELISA. A atividade enzimática da colagenase-1 foi medida usando-se a técnica da digestão do colágeno marcado com o ^{14}C . A atividade enzimática da estromelisina foi medida usando-se a técnica de digestão do substrato Azocoll. O óxido nítrico foi medido usando-se a reação de Greis. A análise estatística foi feita usando-se o teste u de Mann-Whitney. O tenidap induziu uma diminuição significativa na síntese de IL-1 β a 71,3% ($p<0,05$) a concentrações de 20 $\mu\text{g/ml}$ e de 79,3% ($p<0,02$) a concentrações de 50 $\mu\text{g/ml}$. O diclofenaco (125 $\mu\text{g/ml}$) não teve qualquer efeito inibidor da síntese de IL-1 β . Uma redução de 90,4% nos níveis de IL-6 usando-se tenidap a 20 $\mu\text{g/ml}$ ($p<0,005$) e de 96% usando-se tenidap a 50 $\mu\text{g/ml}$ ($p<0,05$) foi observada. O nível de IL-6 nos explantes tratados com diclofenaco não foi diferente dos explantes não tratados que serviram como controle. Em presença do tenidap a 20 $\mu\text{g/ml}$ e a 50 $\mu\text{g/ml}$, a redução da síntese de TNF- α foi de 66,9% ($p<0,05$) e de 77,4%, respectivamente. Os explantes tratados com diclofenaco não apresentaram diferença se comparados aos controles. O tenidap inibiu de maneira extremamente significativa (acima de 90% , $p<0,0001$) a síntese de PGE2 nas três concentrações testadas. De maneira semelhante, o diclofenaco inibiu em 95% ($p<0,0001$) a produção de PGE2 pela membrana da interface.. NO não foi inibido nem pelo tenidap nem pelo diclofenaco. A atividade da estromelisina foi reduzida em 57,1% ($p<0,07$) e 76,6% ($p<0,01$) pelo tenidap a 20 $\mu\text{g/ml}$ e 50 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. A osteólise e a soltura asséptica das próteses totais de quadril tornaram-se um dos problemas dominantes na sobrevida das reconstruções articulares. A inibição simultânea de diversas citocinas e prostaglandinas por um mesmo medicamento pode ter implicações importantes na prevenção e no tratamento futuro da soltura de próteses totais do quadril.

ABSTRACT

Pro-inflammatory cytokines and PGE₂ play an important role in the pathophysiology of osteolysis and implant loosening. Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) are very potent inducers of proteolytic enzymes such as metalloproteases, thereby removing osteoid and providing a surface for osteoclastic bone resorption and ensuing osteolysis. The aim of this study was to evaluate the levels of cytokines and PGE₂ in response to pharmacological agents in explants of interface membranes from failed hip prosthesis. Membranes from failed total hip arthroplasty were retrieved (n=20) and explants were incubated in the absence or presence of tenidap at three different concentrations (5, 20 or 50 μ g/ml) or diclofenac (125 μ g/l). IL-1 β , IL-6, TNF- α , and PGE₂ levels were measured in the culture medium using ELISA kits. Culture media had their enzymatic activity measured for collagenase-1 and gelatinase (¹⁴C-collagen technique) as well as stromelysin (Azocoll) and nitric oxide (Greiss reaction). Statistical analysis was done using the Mann-Whitney *u*-test. A statistically significant decrease in the IL-1 β synthesis was found at two tenidap concentrations tested; with inhibition of 71.3% (*p*<0.05) at 20 μ g/ml concentration and 79.3% (*p*<0.02) at 50 μ g/ml. Diclofenac (125 μ g/L) had no effect on inhibiting IL-1 β synthesis. A 90.4% reduction of IL-6 levels at 20 μ g/ml (*p*<0.005) and 96.0% (*p*<0.05) at 50 μ g/ml was observed. The level of IL-6 in diclofenac treated explants was not different to that in the control explants. TNF- α levels were reduced in the presence of tenidap by 66.9% (*p*<0.05) and 77.4% at concentrations of 20 μ g/ml and 50 μ g/ml, respectively. Diclofenac treated explants were not different than the untreated explants. Tenidap had a marked suppressive effect of over 90% (*p*<0.0001) on PGE₂ synthesis at all three concentrations. Similarly, diclofenac decrease by 95 % (*p*<0.0001) PGE₂ production by the interface membrane. Nitric oxide levels were not reduced neither by tenidap nor by diclofenac. Finally, stromelysin activity was reduced by 57.1% (*p* < 0.07) and 76.6% (*p* < 0.01) by tenidap at concentrations of 20 μ g/ml and 50 μ g/ml, respectively. Finally, diclofenac had no significant effect in reducing stromelysin activity. Osteolysis and aseptic loosening of joint prosthesis become one of the dominant problems in total joint arthroplasty. Simultaneous inhibition of several cytokines and prostaglandins has not yet been previously reported. These findings could have implications in the future therapeutic treatment of failed total joint arthroplasties.

1 INTRODUÇÃO

A artroplastia total do quadril (ATQ) é o procedimento cirúrgico de escolha para pacientes acima de 60 anos de idade que sofrem de artrose (OA) do quadril. Aproximadamente duzentos e quarenta mil ATQ são feitas todo ano nos Estados Unidos e no Canadá, e cerca de 10% destas cirurgias são revisões causadas por osteólise e soltura aséptica. A fisiopatologia da osteólise em ATQ soltas está relacionada a uma resposta agressiva dos macrófagos às partículas de desgaste do implante na interface osso-prótese e à síntese de diversas citocinas, prostaglandinas, metaloproteinases (MMP) e óxido nítrico (NO). A atividade osteoblástica nesta patologia ainda está mal definida, apesar de se saber que os osteoblastos respondem à estimulação das partículas (DEAN et al., 1999). Embora tenha sido demonstrado que os macrófagos poderiam se diferenciar diretamente em células osteoclásticas (SABOKBAR et al., 1997), a cascata fisiopatológica da diferenciação dos macrófagos em osteoclastos responsáveis pela reabsorção óssea nas ATQ é dependente dos osteoblastos (SUDA et al., 1997; ZAMBONIN et al., 1998). O consenso na literatura médica é de que o processo de osteólise e soltura está ligado a causas multifatoriais que incluem o design da prótese, micropartículas de metal, de cimento e de polietileno, bem como o *stress shielding* (HUISKES et al., 1998).

Em qualquer série de ATQ publicada na literatura onde as variáveis demográficas são comparáveis (mesma patologia subjacente, mesmo cirurgião, mesmo tipo de implante, mesma exposição a partículas idênticas, idade média e atividade física comparáveis), vários subgrupos de pacientes desenvolvem osteólise que varia de muito leve a catastrófica. Os sinais clínicos de soltura da ATQ são caracterizados por dor e incapacidade funcional associadas a uma perda óssea periprotética e ao desenvolvimento de uma membrana fibrosa na interface entre a prótese e o osso. As mudanças radiológicas são de início lento e se tornam evidentes apenas depois que uma reabsorção óssea importante tenha ocorrido (HAYASHI et al., 1986).

Poucos tratamentos foram propostos a fim de diminuir a incapacidade funcional e a dor ligadas à soltura das ATQ. Do ponto de vista da fisioterapia, a proteção das articulações contra o excesso de uso é importante. Além disso, recomenda-se às pessoas obesas de emagrecer. Agentes analgésicos como o acetaminofen podem ser utilizados em uma posologia contínua ou, se necessário, segundo a opinião do médico. Vários autores na década de oitenta propuseram vários medicamentos, como a aspirina, um analgésico que é igualmente

um agente anti-inflamatório em altas doses (acima de 4g/dia) e alguns agentes anti-inflamatórios não esteróides (AINS) também são prescritos (WALLIS e SIMKIN, 1983; ROSEMBERG, 1989).

Sabe-se que nem todos os AINS têm as mesmas propriedades farmacológicas no que se refere à proteção contra a degradação da matriz mediada por MMP e alguns têm mesmo um efeito maléfico (OUNISSI-BENKALHA et al., 1996). Quando se pensa em comercializar um novo medicamento que possui novas propriedades, é necessário determinar sua ação sobre os processos patológicos *in vivo* (DINGLE et al., 1987; DINGLE et al., 1991; DINGLE et al., 1993). Para que isto seja possível, no entanto, é imprescindível que a fisiopatologia da doença seja melhor conhecida.

O objetivo deste estudo foi de avaliar a eficiência terapêutica do tenidap em diminuir o nível de citocinas, de metaloproteinases, de óxido nítrico e de prostaglandina E_2 em explantes de membranas recuperadas da interface de ATQ soltas em comparação a explantes tratados com diclofenaco, um anti-inflamatório não-esteróide muito utilizado no tratamento dos sintomas da soltura das ATQ.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PERSPECTIVA HISTÓRICA DA SOLTURA DAS ATQ

A soltura aséptica foi descrita nos anos 60 por Sir John Charnley, quando os componentes acetabulares em politetrafluoroetileno (PTFE) que ele usava necessitaram revisão de 1 a 3 anos após serem implantados (CHARNLEY, 1960; CHARNLEY, 1961; CHARNLEY, 1964; CHARNLEY, 1970; CHARNLEY et al., 1968; WROBLEWSKI, 1986). Após a utilização de cúpulas em polietileno, Charnley observou uma diminuição dramática na quantidade de partículas de desgaste produzidas e também na incidência de cirurgia de revisão das ATQ (CHARNLEY et al., 1968). Nos casos que necessitaram revisão, Charnley encontrou invariavelmente um tecido fibroso com abundantes macrófagos que envolvia o implante na interface entre o osso e o cimento (BULLOUGH et al., 1988; CHARNLEY, 1964; CHARNLEY et al., 1968; MIRRA et al., 1976; MIRRA et al., 1982).

WILLERT e SEMLITSCH propuseram em seguida que a soltura aséptica seria o resultado da quantidade importante de partículas de desgaste da prótese vistas ao microscópio dentro e ao redor dos macrófagos (WILLERT e SEMLITSCH, 1976; WILLERT e SEMLITSCH M, 1977). Este quadro correspondia à maior parte do tecido fibroso ao redor da prótese. Eles sugeriram que essas partículas eram biologicamente ativas e induziam uma resposta macrofágica nos tecidos vizinhos. MIRRA et al., estudaram membranas periprostéticas recuperadas em revisões de ATQ et al., também encontraram camadas de macrófagos em um estroma fibroso entrelaçados com células gigantes multinucleadas, partículas de polimetilmetacrilato (PMMA) e partículas metálicas (MIRRA et al., 1976; MIRRA et al., 1982). GOLDRING et al., em 1983 demonstraram que estas membranas da interface, quando colocadas em cultura, eram capazes de produzir collagenase e PGE₂, um estimulante potente da reabsorção óssea *in vivo* (GOLDRING et al., 1983). Desde então, varios pesquisadores têm mostrado que a atividade celular nesta membrana é capaz de produzir uma variedade de enzimas, prostaglandinas e citocinas, que são capazes de estimular a reabsorção óssea osteoclástica e a formação de um tecido fibroso (DORR et al., 1990; KIM et al., 1993; SHANBHAG et al., 1995).

Durante estas primeiras pesquisas, as próteses eram fixadas com cimento e muitos pesquisadores concluíram que as partículas de PMMA eram a causa da osteólise e da soltura, o que os levou a chamar esta pathologie de 'doença do cimento' (FRIEDMAN et al., 1993;

JASTY et al., 1993; JASTY et al., 1986; JASTY et al., 1991; JONES, HUNGERFORD, 1987; WILLERT e SEMLITSCH, 1977). Melhorias nas técnicas de cimentação e alterações das propriedades do cimento foram enfatizadas como meios de reduzir a incidência de soltura aséptica. Técnicas de cimentação de segunda e terceira geração foram desenvolvidas, incluindo-se aí a utilização de cimento sob pressão, plugues medulares, pre-coating e texturização do implante, redução da porosidade do cimento por centrifugação ou vácuo e centralizadores da haste femoral (BURKE et al., 1984; HARRIS et al., 1988; HARRIS et al., 1986; MULROY et al., 1990; PARK, 1979; PARK, 1985; RUBASH e HARRIS, 1988). No entanto, mesmo com estes avanços e a introdução da artroplastia não cimentada, os problemas do osteólise e soltura aséptica persistiram. Isto levou cirurgiões e pesquisadores a sugerir que as partículas de desgaste originárias do polietileno de peso molecular ultra elevado (UHMWPE) e do metal seriam as causas potenciais da osteólise e da soltura das artroplastias (HUK et al., 1994; MALONEY et al., 1990; SCHMALZRIED et al., 1992; SHANBHAG et al., 1994; TANZER et al., 1992). A Declaração do Consenso do Instituto Nacional de Saúde dos EUA de 1994 enfatizava o fato que as partículas de UHMWPE seriam a causa primeira de osteólise e soltura das ATQ (NIH CONSENSUS STATEMENT, 1994).

2.2 APRESENTAÇÃO CLÍNICA DA OSTEOLISE ET DA SOLTURA DAS ATQ

Geralmente, a perda óssea periprotética inicia-se como um fenômeno linear, difuso e dissecante que compromete a interface osso-implante. Esta manifestação tradicional de soltura resulta em um alargamento denormalizado do canal femoral e uma osteólise endosteal. De maneira alternativa, a perda óssea pode aparecer focalmente, se manifestando como uma lesão lítica endosteal (JACOBS et al., 1995; MALONEY et al., 1990; MOHLER et al., 1995; TANZER et al., 1992). Radiograficamente, a soltura clássica das hastes femorais não cimentadas inclui uma radiotransparência na interface osso-implante e migração subsequente do componente. Em componentes cimentados, radiotransparências entre o metal e o cimento, além de fissuras no cimento, são também observadas (GOODMAN et al., 1989; BECKENBAUGH et al., 1978; CAMERON et al., 1980; GRUEN et al., 1979; HARRIS et al., 1986; O'NEILL et al., 1986). A radiotransparência na interface osso-cimento é causada por uma perda óssea, pela interposição de tecido fibroso, pela fragmentação do cimento ou por uma combinação destes fenômenos. Lesões focais, por outro lado, aparecem radiologicamente como imagens em gota de lágrima na interface osso-cimento ou osso-implante. Estas lesões focais podem ser vistas tanto em componentes estáveis como instáveis

e, uma vez presentes, tendem a progredir e podem ser observadas em radiografias seriadas (MALONEY et al., 1990; TANZER et al., 1992). O resultado final é tipicamente uma prótese solta que necessita uma cirurgia de revisão ou ocasionalmente uma fratura periprotética.

2.3 MECANISMOS DE SOLTURA DAS ATQ

WILLERT e SEMLITSCH propuseram inicialmente que as partículas de desgaste geradas tanto nas superfícies articulares quanto nas superfícies dos implantes seriam eliminadas do espaço articular pelos macrófagos e transportados pelo sistema linfático (WILLERT e SEMLITSCH, 1976; WILLERT e SEMLITSCH, 1977). Se o volume de partículas excede a capacidade de eliminação da circulação local, as partículas ficariam retidas localmente. As partículas acumuladas iniciariam então a formação de granulomas periprotéticos. Os granulomas começam tipicamente na pseudocápsula. Se a produção de partículas e a resposta dos macrófagos persistem, o granuloma se estenderia até a interface osso-cimento, sacrificando a fixação do implante e resultando num componente solto (WILLERT e SEMLITSCH, 1977). A análise histológica dos tecidos periprotéticos tem demonstrado que estes granulomas contêm partículas muito finas dentro dos macrófagos, bem como partículas maiores cercadas por células gigantes à corpo estranho (KIM et al., 1993; KIM et al., 1994; MIRRA et al., 1976; VERNON-ROBERTS et al., 1976).

Enquanto as observações de Willert et Semlitsch foram feitas a partir de componentes cimentados, acredita-se que um processo similar ocorra em próteses não cimentadas (JACOBS et al., 1992; MALONEY et al., 1990; SCHMALZRIED et al., 1992; WILLERT et al., 1990; WILLERT et al., 1992). Após estudar com cuidado os tecidos que envolvem os componentes soltos, Willert e Semlitsch sugeriram que todo o microambiente da articulação participa no processo de eliminação das partículas (WILLERT et al., 1977). SCHMALZRIED et al., explicaram que as partículas presentes na articulação podem ser carregadas para todas as áreas da articulação que são acessíveis ao líquido articular (SCHMALZRIED et al., 1992). O líquido articular pode carregar partículas geradas na superfície articular para a região periprotética. O padrão de fluxo do líquido sinovial determinaria se as partículas seriam dispersadas linearmente ao longo do componente ou acumuladas em diversas áreas focais. O padrão do depósito das partículas e a resposta biológica subsequente determinaria se a osteólise seria linear ou focal (WILLERT et al., 1977).

Vários outros investigadores apóiam a tese da associação entre as membranas da interface, a resposta dos macrófagos e a osteólise induzida pelas partículas (GOLDRING et al., 1983; HARRIS et al., 1976; JACOBS et al., 1992; KIM et al., 1993; KIM et al., 1994; MURRAY et al., 1990; WILLERT et al., 1990).

Fatores mecânicos podem ter um papel importante na soltura dos componentes. Por exemplo, a mobilidade da prótese pode afetar as células ao redor do implante de duas maneiras. A primeira é por ação direta, estimulando os macrófagos a produzir citocinas e metaloproteínas. A segunda é criando condições que promovem desgaste mecânico e corrosão, assim liberando partículas metálicas, poliméricas e íons de metal que estimulam o processo inflamatório. Outros fatores mecânicos também estão implicados na soltura asséptica. Alguns autores sugeriram que o ato cirúrgico em si pode iniciar o processo de soltura (MIRRA et al., 1976; MIRRA et al., 1998; VERNON-ROBERTS et al., 1976; VERNON-ROBERTS et al., 1977). A perfuração do osso, a preparação, os efeitos térmicos da polimerização e a toxicidade do cimento de PMMA podem causar a necrose do osso circunvizinho (CHARNLEY, 1970b; WILLERT et al., 1974). Esse osso necrótico seria substituído por tecido fibroso e impediria uma fixação adequada do cimento.

Uma fixação inicial bem-sucedida pode falhar devido a fadiga (STAUFFER, 1982). O movimento do implante solto aumenta o número e a gravidade das fraturas ao longo da interface e provoca uma reação tissular adversa às partículas de PMMA nos implantes cimentados, aumentando assim a reação a corpo estranho. Além disso, uma combinação de carga axial e design deficiente do implante também pode fraturar o manto de cimento (STAUFFER, 1982). Carga axial elevada pode aumentar o stress circunferencial em um manto de cimento muito fino além da sua capacidade mecânica, causando fraturas axiais no manto. A migração da haste e fragmentação do cimento resultariam em um aumento da reação a corpo estranho.

Devido ao fato que os componentes estão constantemente expostos a um meio biológico, incluindo proteínas do plasma e células responsáveis pela imunidade, é plausível que a resposta imunitária possa estar envolvida na soltura das ATQ. EVANS et al., em 1974 foram um dos primeiros a sugerir que uma resposta imune aos íons de metal liberados pelos componentes poderia iniciar o processo de soltura (EVANS et al., 1974). Usando um teste cutâneo, eles descobriram que 9 de 14 pacientes com próteses totais de quadril metal-metal eram sensíveis a um ou mais componentes das ligas utilizadas. No entanto, nenhum dos 24 pacientes com próteses bem fixas era sensível. Estes investigadores postularam que alguns pacientes poderiam se tornar sensíveis ao cobalto, ao cromo ou ao níquel liberado nos tecidos

vizinhos. A reação de hipersensibilidade de tipo IV que se seguiria poderia causar mudanças nos vasos sanguíneos adjacentes ao implante, levando à necrose óssea. Um osso avascular é muito sensível à fadiga, assim, com o passar do tempo, a fixação óssea com o cimento seriam substituídas por um tecido fibroso na interface osso-cimento, levando à soltura do componente. Vários estudos subsequentes em pacientes com próteses soltas, a hipersensibilidade de tipo IV não estava associada à soltura asséptica (BROWN et al., 1977; CAMPBELL et al., 1995; DiCARLO et al., 1992; HAYASHI et al., 1986; MERRIT et al., 1981; ROOKER et al., 1980). Outros pesquisadores examinaram tecidos recuperados de próteses cimentadas e não cimentadas em busca de células envolvidas em uma possível resposta imune (LALOR et al., 1991; SANTAVIRTA et al., 1990; SANTAVIRTA et al., 1991). Usando anticorpos específicos a receptores para vários tipos celulares, eles freqüentemente observaram células de tipo T e macrófagos ativados, e notaram a ausência de células de tipo B ou de plasmócitos. Além disso, as células de tipo T encontradas eram células em repouso não ativadas (LALOR et al., 1991). Assim, existe controvérsia com relação ao papel da resposta imune na osteólise e soltura asséptica das ATQ.

2.4 PROCESSOS ENZIMÁTICOS NA DEGRADAÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR

Implicações na indução e na progressão da osteólise

REVELL et al. em 1988 observaram que os produtos de degradação da matriz óssea ou cartilaginosa seriam liberados no líquido sinovial e fagocitados pelos macrófagos da sinovial, ocasionando uma reação inflamatória secundária neste tecido. A inflamação sinovial seria responsável por uma aceleração da degradação da matriz, pela via da síntese de enzimas proteolíticas e de fatores catabólicos (citocinas: IL-1, TNF- α , entre outros) podendo, por difusão, estimular a produção enzimática celular e conduzir a um mecanismo de retroativação positivo do processo degenerativo (REVELL et al., 1988).

MARTEL-PELLETIER et al., em 1992 descreveram uma síntese aumentada de citocinas que estimulariam a produção de MMP não apenas das células sinoviais mas também dos condrócito (MARTEL-PELLETIER et al., 1992). HARAOUÏ et al., em 1991, observaram que processos enzimáticos, associados a fatores mecânicos, são responsáveis pela degradação da matriz cartilaginosa. Estes processos enzimáticos não parecem estar ligados a um único

sistema, mas sim a uma cascata enzimática similar àquela do sistema de coagulação (HARAOUI et al., 1991).

Segundo MURPHY et al., em 1987, as famílias de enzimas que teriam um papel na degradação da matriz extracelular são as MMP, as serina-proteases e as tioproteases. As principais MMP são a collagenase tissular, a estromelisina-1 e as gelatinases (Tabela 1 pág. 11). A estromelisina tem um duplo papel no processo de degradação da cartilagem devido ao seu papel de ativação da procolagenase (MURPHY et al., 1987).

MOCHAN e KELLER em 1984 propuseram que, além da sua função de ativador enzimático, a plasmina pode degradar a matriz extracelular por uma proteólise direta do monômero de PG. É também possível que a plasmina contribua à transformação da pro-IL-1 em sua forma madura (ativa) (MOCHAN e KELLER, 1984). HE et al., em 1989 propuseram as enzimas da família das serinas e tioproteases como ativadores fisiológicos das MMP. O sistema ativador do plasminogênio (PA)/ plasmina e a catepsina B são os candidatos potenciais a um tal papel (HE et al., 1989). MARTEL-PELLETIER et al., em 1991 invocaram a possibilidade que o sistema PA/ plasmina possa ativar as MMP após a demonstração de um aumento importante da atividade da plasmina e do ativador do plasminogênio (de tipo uroquinase) na cartilagem OA e de uma correlação direta e positiva entre os níveis de plasmina e de collagenase na forma ativa (MARTEL-PELLETIER et al., 1991). MARTEL-PELLETIER et al., em 1991 observaram que o sistema PA é também influenciado pela IL-1. A IL-1 induz um aumento do PA de maneira dose-dependente ao mesmo tempo que uma diminuição importante da síntese do PAI-1, inibidor do PA. Estas observações *in vitro* complementam os resultados *ex vivo* obtidos a partir da cartilagem OA e acentuam o papel desta citocina na fisiopatologia da artrose. Além disso, o efeito acentuado da IL-1 sobre o PAI-1, associada à estimulação do PA, seria um fator favorecedor da produção de plasmina e da ativação das MMP (MARTEL-PELLETIER et al., 1991).

TABELA 1 - AS METALOPROTEASES

ENZIMA	MMP	SUBSTRATO
I. Collagenases		

Colagenase tissular	MMP-1	Colágeno de tipo I, II, III, VII, X,
Colagenase neutrofílica	MMP-8	Colágeno de tipo I, II, e III
Colagenase tumoral	MMP-13	Colágeno de tipo I e II
<hr/>		
II. Estromelisina		
Estromelisina-1	MMP-3	Proteoglicanes, a fibronectina, a laminina, o colágeno de tipo III, IV, IX et X e os telopeptídeos
Estromelisina2	MMP-10	Proteoglicanes, a fibronectina e a gelatina
Estromelisina-3	MMP-11	Desconhecido
<hr/>		
III. Gelatinases		
72 kDa	MMP-2	Gelatina, o colágeno de tipo IV, V, VII, XI, a fibronectina, a laminina e os proteoglicanes
92 kDa	MMP-9	Gelatina, o colágeno de tipo IV e V e os proteoglicanes
<hr/>		
IV. Outras		
PUMP-1/ Matrilisina	MMP-7	Proteoglicanes, a fibronectina e a gelatina
Metalo-elastase	MMP-12	Elastina, fibronectina

Fonte: MURPHY, G.; DOCHERTY, A.J.P. 1992

MARTEL-PELLETIER et al., em 1990 descreveram a degradação da matriz extracelular na artrose igualmente na região pericelular de condrócitos. A catepsina B, uma enzima lisossomal, e a estromelisina têm uma atividade máxima a um pH ácido e parecem ter um papel importante neste processo. Um estudo revelou igualmente uma baixa concomitante

da atividade inibidora das cisteino-proteases nas lesões da cartilagem OA (MARTEL-PELLETIER et al., 1990a).

DEAN et al., em 1989, MARTEL-PELLETIER e PELLETIER em 1990 propuseram que as citocinas poderiam estar ligadas ao desequilíbrio entre os níveis do TIMP e das MMP nos tecidos OA. Com efeito, a IL-1 tem a propriedade de diminuir a síntese do TIMP-1 *in vitro* em paralelo a uma elevação da síntese das MMP pelas células (DEAN et al., 1989; MARTEL-PELLETIER et al., 1990b). MARTEL-PELLETIER et al., em 1990 propuseram que a síntese das MMP esta diretamente ligada à gravidade da inflamação local e ao nível de IL-1 β presente. *In vitro*, os explantes de sinoviais OA sintetizam de maneira preferencial a IL-1 β , sua síntese estando ainda mais aumentada pela presença de LPS (lipopolissacarídeos) (MARTEL-PELLETIER et al., 1990b). MARTEL-PELLETIER et al., em 1991 propuseram que a síntese de citocinas proinflamatórias (IL-1, TNF- α) pelas células sinoviais aumentaria a síntese das enzimas proteolíticas ao nível da cartilagem e da membrana sinovial, induzindo assim uma aceleração da destruição articular (MARTEL-PELLETIER et al., 1991).

MANKIN e BRANDT em 1992 sugeriram que a atividade biológica das MMP seria controlada pelo jogo entre os inibidores e os ativadores enzimáticos. Na cartilagem com artrose, por exemplo, existe um desequilíbrio entre a quantidade do inibidor específico das MMP, o TIMP, e essas metaloproteases. Isto gera um déficit relativo, possivelmente responsável pelo aumento da atividade metabólica das MMP encontradas neste tecido (MANKIN e BRANDT, 1992). CLARK et al., em 1993 analisaram os produtos do catabolismo da degradação da cartilagem liberados no líquido sinovial e fagocitados pelas células da membrana sinovial que induzem uma reação inflamatória. A inflamação sinovial aumenta a síntese local de enzimas proteolíticas dos macrófagos e das células da superfície sinovial (sinoviócitos), produzindo uma destruição local dos tecidos periarticulares e, possivelmente, uma degradação da cartilagem pela difusão de enzimas em direção à matriz cartilaginosa através do líquido sinovial (CLARK et al., 1993).

2.5 TENIDAP

2.5.1 Estrutura e propriedades

O Tenidap (Pfizer Central Research, Groton, Connecticut, EUA), é um modulador da síntese das citocinas da classe dos oxíndoles com propriedades inibidoras sobre a ciclo-oxigenase. Sua estrutura é a seguinte: [(Z)-5-cloro-2,3-dihidro-3-(hidroxi-2-tienilmetileno)-2-oxi-1H-indole-1-carboxamida]. Trata-se de um medicamento de utilização experimental.

Vários estudos *in vitro* e *in vivo* em animais demonstraram as seguintes características do tenidap: inibição ou diminuição de i) 5-lipoxigenase (TODD e SORKIN, 1988), ii) ciclo-oxigenase (BLACKBURN et al., 1991a, iii) síntese e secreção de IL-1 (OTTERNESS et al., 1991), iv) liberação dos grânulos dos lisossomos dos polimorfonucleares mediada pelos complexos imunes (BLACKBURN Jr et al., 1991a, 1991b), v) síntese de MMP pelos condrócitos estimulados com IL-1 (PELLETIER et al., 1993a), vi) síntese e/ou secreção de interleucina-6 (IL-6) (LITTMAN et al., 1993), vii) receptores de IL-1 dos condrócitos (PELLETIER et al., 1993a), viii) degradação da cartilagem pela IL-1 (DINGLE et al., 1993); ix) nível de receptores da IL-1 e de expressão da collagenase nos sinoviócitos (MARTEL-PELLETIER et al., 1996). Além disso, o Tenidap diminuiria o nível plasmático de IL-6 nos pacientes com artrite reumatóide (LITTMAN et al., 1993).

SMITH et al., em 1990 estudaram a interação entre o tenidap, alimentação e vários medicamentos suscetíveis de serem usados concomitantemente em um eventual tratamento, tais como aos cumarínicos, a dogoxina, os antiácidos, o lítio, a fenitoína, os diuréticos, a tolbutamida, os anticoncepcionais orais e a cimetidina, entre outros, e demonstraram um perfil comparável aos outros AINS que inibem a ciclo-oxigenase (SMITH et al., 1990). O perfil clínico de tolerância é comparável ao dos AINS. Os efeitos secundários mais frequentes são aqueles associados ao sistema gastrointestinal.(SMITH et al., 1990). Após administração oral de Tenidap (120 mg) a voluntários sadios, constatou-se que 85% era absorvido com um nível plasmático máximo de 2 a 4 horas. A meia-vida é de aproximadamente 23 horas e os níveis plasmáticos estáveis após 11 dias são de aproximadamente 20µg/ml. As concentrações no líquido sinovial se estabilizam após 7 dias de administração do medicamento. Segundo KRASKA et al., em 1993, os níveis séricos nos pacientes reumatóides que receberam 120mg de tenidap via oral/dia são de 20µg/ml (KRASKA et al., 1993). Nos pacientes com artrose que receberam 40 mg de tenidap via oral/dia os níveis são de 10µg/ml.

2.5.2 Efeito sobre as oxigenases

SMITH et al., em 1990 e BLACKBURN Jr. em 1991 estudaram os metabólitos do ácido araquidônico como importantes mediadores da inflamação. A maior parte deles parece

ser formado pelo metabolismo do ácido araquidônico via a ciclo-oxigenase e a 5-lipoxigenase. Os produtos da ciclo-oxigenase, como as prostaglandinas PGE₂, a PGI₂ e a PGF₂, funcionam isoladamente ou em paralelo com outros mediadores da inflamação, induzindo uma vasodilatação e uma sensibilidade aumentada das terminações nervosas aos efeitos da bradicinina (BLACKBURN Jr. et al., 1991b). A PGE₂ pode também facilitar a reabsorção óssea, o que é particularmente importante nas artrites inflamatórias (SMITH et al., 1990; BLACKBURN Jr. et al., 1991a). A maior parte dos AINS disponíveis são capazes de inibir a produção de derivados do metabolismo do ácido araquidônico pela ciclo-oxigenase, mas não os produtos derivados da 5-lipoxigenase. Estudos *in vitro* confirmam esta dupla atividade de inibição pelo tenidap (BLACKBURN Jr. et al., 1991b); outros demonstraram que ele inibe a atividade da ciclo-oxigenase nos neutrófilos humanos, com uma concentração de inibição a 50% (IC₅₀) de 0,01 μM. Uma IC₅₀ de 18 μM para a inibição da 5-lipoxigenase nos neutrófilos humanos foi igualmente descrita. No entanto, ela é de apenas 9,6 μM nas células tumorais basófilas de camundongo (BLACKBURN Jr. et al., 1991b). As concentrações de tenidap necessárias para inibir *in vitro* a ciclo-oxigenase e a 5-lipoxigenase são comparáveis àquelas demonstradas *in vivo* e sugerem que a inibição da 5-lipoxigenase e da ciclo-oxigenase pode ocorrer ao nível dos neutrófilos, dos monócitos e de outras células inflamatórias que produzem estes derivados *in vivo* (BLACKBURN Jr. et al., 1991a).

Atualmente, o mecanismo pelo qual a 5-lipoxigenase é inibida pelo tenidap não é conhecido. TODD e SORKIN em 1988 propuseram uma inibição direta desta oxigenase ou ainda uma estimulação da recaptação do ácido araquidônico pela membrana (TODD e SORKIN, 1988). LITTMAN et al., em 1990 sugeriram que a inibição da atividade da 5-lipoxigenase poderia também ocorrer por um bloqueio da translocação da 5-lipoxigenase ou pela inibição da expressão funcional da enzima 5-lipoxigenase, um fenômeno semelhante àquele constatado com os sais de ouro nas células HL-60 (LITTMAN et al., 1990).

2.5.3 Efeito sobre a Interleucina-1

PELLETIER et al., em 1993 demonstraram que o tenidap diminui o número de receptores da IL-1 (IL-1R) nos condrócitos, sem uma mudança significativa de sua afinidade. A redução dos IL-1R produz uma diminuição acentuada da estimulação da expressão (ARNm) das MMP e de sua síntese pelos condrócitos quando estimulados pela IL-1β (PELLETIER et al., 1993a).

Os mesmos autores demonstraram que o tenidap inibe a produção de IL-1 pelos macrófagos peritoniais de camundongo estimulados com LPS e Zymosan (PELLETIER et al., 1993a). A uma mesma concentração, o tenidap inibe a síntese do peptídio leucotrieno-C. Em concentrações de 10 e 3 $\mu\text{M/ml}$, os efeitos do tenidap sobre a síntese de proteínas, a viabilidade e a proliferação celular não foram significativos, sugerindo que a síntese de IL-1 foi inibida a concentrações muito mais baixas que aquelas onde a viabilidade celular ou a síntese de proteínas seria afetada (PELLETIER et al., 1993a).

2.5.4 Efeito sobre as MMP

Pelletier et al. em 1993 demonstraram que o tenidap, a concentrações terapêuticas *in vitro*, reduziu de maneira acentuada a síntese e a expressão da collagenase e da estromelisina-1 nos condrócitos estimulados com IL-1 (PELLETIER et al., 1993a). Também demonstraram *in vitro* que concentrações crescentes de IL-1 β recombinante humana (rHuIL-1 β) induzem um aumento logarítmico e dose-dependente da collagenase e da estromelisina nos condrócitos. Quando as células foram incubadas durante 18 horas com uma concentração terapêutica de tenidap (20 $\mu\text{g/ml}$) antes da estimulação pela rHuIL-1 β , o tenidap induziu uma redução progressiva da síntese das MMP até 70% (PELLETIER et al., 1993a).

3 MATERIAL E MÉTODO

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DOS PACIENTES

A indicação para a cirurgia de revisão incluíram dor e evidência radiológica de soltura. Radiologicamente, a presença de linhas radiotransparentes na interface osso-cimento e a migração do componente confirmaram a soltura. As radiografias dos componentes soltos com osteólise focal apresentavam uma ou mais áreas císticas adjacentes ao manto de cimento ou ao osso (figura 1).

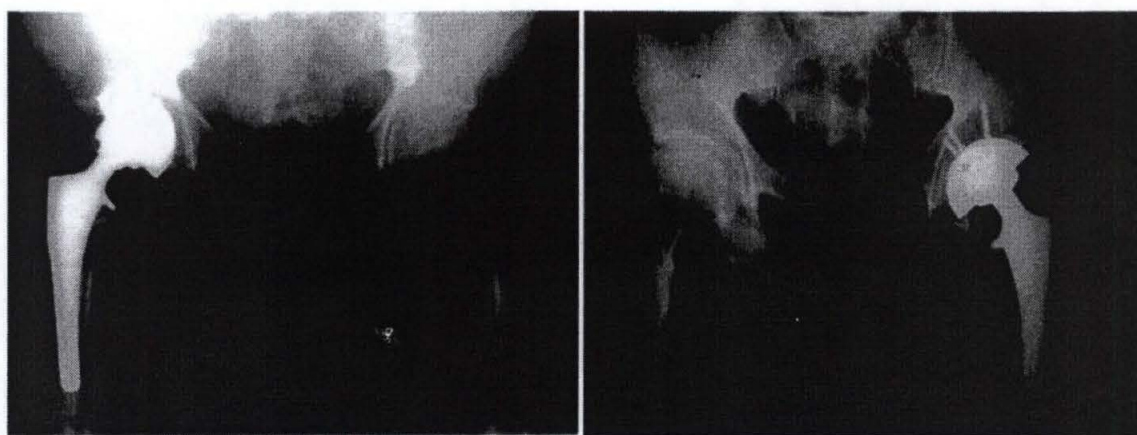
FIGURA 1 - ASPECTO RADIOLÓGICO DE UMA LESÃO OSTEOLÍTICA MASIVA EM UMA ARTROPLASTIA TOTAL DO QUADRIL SOLTA



Nota: Observe a lesão expansiva que se estende além do osso subcondral em direção ao ílio, isquio e púbis. Além disso, existe também uma extensa reabsorção óssea na região metafisária do fêmur proximal.

As membranas da interface osso-cimento foram obtidas no momento da cirurgia de vinte pacientes que apresentavam soltura clínica e radiológica da prótese total de quadril. Todos os pacientes selecionados apresentavam uma prótese total de tipo híbrida com as superfícies de contato em metal-polietileno (HUMWPE). Esta standardização permitiu minimizar ao máximo a variabilidade individual causada por diferentes partículas encontradas nos tecidos estudados. As membranas foram recuperadas da região metafisária adjacente à haste femoral correspondentes às zonas I e VII de Gruen (GRUEN et al., 1976) (figura 2).

FIGURA 2 - ASPECTO RADIOLÓGICO DE OSTEOLITE FEMORAL EM DUAS PRÓTESES DE PROCEDÊNCIA DIFERENTE. AMBAS AS HASTES SÃO NÃO CIMENTADAS



Doze dos vinte pacientes eram homens e oito eram mulheres. A idade média ($61,7 \pm 5,6$ anos; $65,4 \pm 5,6$ anos, respectivamente) e o tempo decorrido entre a prótese primária e a revisão ($57,0 \pm 12,9$ meses; $49,0 \pm 11,5$ meses, respectivamente) para homens e mulheres eram similares. Em todos os pacientes, a apresentação clínica e radiológica eram de soltura asséptica da ATQ. Casos infectados foram excluídos pela história clínica, análise em patologia e culturas per-operatória negativas (tabela 2).

Este estudo foi aprovado pelo Comité Institucional de Pesquisa e pelo Comité Institucional de Ética do Centre Hospitalier de l'Université de Montréal. Todos os pacientes concordaram em participar do estudo e assinaram um consentimento escrito.

TABELA 2 – CARACTERÍSTICAS DAS ATQs SOLTAS E O GRAU DE OSTEOLISE

ATQs – OSTEOLISE MASSIVA CAVITÁRIA					ATQs – OSTEOLISE LINEAR				
Paciente	Idade/ Sexo	Meses p/revisão	Grau de desgaste	Causa da soltura	Paciente	Idade/ Sexo	Meses p/revisão	Grau de desgaste	Causa da soltura
MP	75/F	34	Moderado	Osteolise cavitária	TM	71/F	34	Massivo	Luxação prótese osteolise linear
AJP	79/F	86	Moderado	Osteolise cavitária	MB	78/F	118	Massivo	Osteolise linear / luxação prótese
RB	77/M	54	Massivo	Linear/ cavitária	TK	68/M	62	Massivo	Osteolise linear
AL	68/F	40	Massivo	Fratura femoral / osteolise cavitária	GR	42/F	38	Moderado	Osteolise linear/ fratura periprotéi ca
DDL	63/F	64	Moderado	Linear / cavitária osteolise	AP	62/M	49	Moderado	Osteolise linear / fratura periprotéi ca
TB	59/M	49	Massivo	Osteolise cavitária	JP	59/M	41	Moderado	Usura massiva do liner / osteolise linear
JPP	79/F	86	Moderado	Cavitária	AO	79/M	118	Massivo	Osteolise linear
PT	62/M	64	Moderado	Linear/ cavitária	PJ	61/M	49	Moderado	Osteolise linear
JMP	74/M	44	Moderado	Linear/ Cavitária	MD	72/M	34	Massivo	Luxação de prótese
AB	58/M	49	Massivo	Osteolise cavitária	SO	69/M	41	Moderado	Osteolise linear

Todos os pacientes com soltura da prótese tinham um diagnóstico primário de artrose do quadril quando da primeira cirurgia. Apenas próteses híbridas com a haste solta foram analisadas neste estudo a fim de standardizar a coleta de dados.

3.2 CULTURA DOS EXPLANTES DE MEMBRANAS DA INTERFACE OSSO-IMPLANTE

Cada membrana da interface foi dissecada assepticamente do osso subjacente e lavada em solução salina à 0,5% resfriada à 4°C. Os espécimens foram sectionados em pequenos fragmentos de 4 a 5 mm de diâmetro. Os explantes pesando em média 250mg foram preparados, divididos de maneira aleatória e colocados em placas de cultura de 12 espaços (Costar, Cambridge, MA, EUA) com 4ml de meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Gibco, Grand Island, EUA) sem soro, e contendo penicilina/estreptomicina (100U/ml e 100 µg/ml, respectivamente). As culturas foram incubadas à 37°C por 72 horas em uma mistura de ar humidificada contendo 5% de gas carbônico. Às culturas acrescentou-se separadamente ou o medicamento experimental tenidap (Pfizer Central Research, Groton, EUA) em quatro concentrações diferentes (0, 5, 20 ou 50 µg/ml), ou o anti-inflamatório diclofenaco (Sigma St. Louis, MO, EUA) a uma concentração de 125µg/ml. A concentração plasmática ideal para atingir níveis terapêuticos em pacientes é de 20µg/ml (CALDWELL et al., 1995), enquanto que a concentração de diclofenaco usada no presente estudo corresponde aos níveis plasmáticos encontrados após administração oral do medicamento em pacientes (FOWLER et al., 1983).

Todas as experiências foram feitas em duplicata. O tenidap e o diclofenaco foram dissolvidos em etanol e diluídos em seguida para atingir a concentração final. Em cada incubação, a concentração do etanol não excedeu 0,1% (volume/volume). Para cada experiência, houve controles correspondentes com etanol. Ao final do período de incubação, os explantes foram pesados e o meio de cultura foi coletado e guardado a -80°C (OUNISSI-BENKALHA et al., 1996).

3.3 ANÁLISE DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS METALOPROTEASES

A análise da atividade das MMP do explante de membrana foi feita como descrito na literatura com ligeiras modificações (DEAN et al., 1989; FERNANDES et al., 1998). O meio de cultura foi utilizado em alíquotas e a destruição seletiva do inibidor tissular das MMP (TIMP) foi conseguida por redução e alquilação. De maneira sucinta, o meio de cultura foi incubado com ditioneitol 2mM (37°C, 1 hora), seguido por iodoacetamida 5mM (4°C, 30 minutos). Os reagentes foram em seguida retirados do extrato por diálise (4°C, 18 horas) contra o meio de cultura descrito acima.

A atividade da collagenase no meio de cultura foi medida usando-se colágeno de tipo I sem telopeptídeo retirado de tendão de cauda de rato e acetilado com anidrido acético - ^{14}C (DEAN et WOESSNER Jr, 1985). Cem microlitros de uma suspensão de colágeno - ^{14}C (12.000 DPM) foram incubados sob as seguintes condições: 1) com uma alíquota de 250 μl do meio de cultura em presença de ácido aminofenilmercúrico (APMA) a 1mM e 2) com uma alíquota de 250 μl do meio de cultura contendo APMA a 1mM e 25 mM de EDTA, para servir como controle negativo. A mistura foi incubada (37°C, 48 horas) após o que ela foi centrifugada (12.000g, 15 minutos, 4°C). A radioatividade contida no sobrenadante foi determinada em um contador de cintilação (Beta Rack, MOdelo 1218; LKB, Estocolmo, Suécia). A atividade enzimática foi expressa em unidades por grama de tecido fresco (w.w.), no qual uma unidade corresponde à hidrólise de 1 μg do substrato/hora a 37°C.

A atividade da estromelisina no meio de cultura foi medida pelo método de CHAVIRA et al. (CHAVIRA Jr. et al., 1984) usando-se azocoll (Calbiochem-Behring Corp., La Jola, Ca, EUA) como substrato. O meio de cultura foi primeiramente dializado (4°C, 48 horas) contra um tampão de acetato de sódio (50mM NaAc, 10mM CaCl_2 , 0,05% Brij-35, pH 5,5) e 100 μl de uma suspensão de azocoll foram incubados sob as seguintes condições: 1) com uma alíquota de 250 μl do meio de cultura contendo APMA a 1 mM e 2) com uma alíquota de 250 μl do meio de cultura contendo APMA a 1 mM e 1,10 o-fenetrolina a 1mM, para servir como controle. Após a incubação (37°C, 48 horas) e centrifugação (4°C, 15 minutos, 12.000g), a densidade ótica do sobrenadante foi determinada por análise espectrofotométrica. A atividade enzimática foi expressa em unidades por grama de tecido fresco (w.w.), no qual uma unidade corresponde à hidrólise de 1 μg do substrato/hora a 37°C.

3.4 ANÁLISE DO NÍVEL DE NITRITOS

O nível de nitrito foi determinado no meio de cultura por se tratar de um produto final do óxido nítrico produzido pelas células. Estas determinações usam um teste espectrofotométrico baseado na reação de Greiss (GREEN et al., 1982) e medindo a absorbância a 550nm. O nitrito conta por cerca de 50% do NO produzido na cultura de explantes. De maneira sucinta, 200 μl do reagente de Gries (1 Vol 1% sulfanilamida em 5% H_3PO_4 e 1 Vol 0,1% dihidrocloridrato de naftiletilenediamina em H_2O), preparado a fresco foi adicionado a 200 μl de meio de cultura, misturado e mantido a temperatura ambiente por 30 minutos. Alíquotas foram centrifugadas (12.000 rpm, 2 min.) (Microfuge 12, Beckman Inc. NY, EUA). O sobrenadante foi lido em um espectrofotômetro (Beckman DU 640,

Beckman Inc., NY, EUA) a 550nm. Os resultados foram normalizados a uma curva standard e os resultados expressos em nmol/g de tecido a fresco.

3.5 ANÁLISE DO NÍVEL DE CITOCINAS

Os níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF- α foram determinados no meio de cultura dos explantes usando-se um teste imunoabsorvente ligado a enzima de fase sólida específica à duplo anticorpo (ELISA) (SHI et al., 2002). Os kits de IL-1 β , IL-6 e TNF- α (alta sensibilidade) foram obtidos de R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA. Cada ELISA foi utilizado segundo as especificações do fabricante. A sensibilidade do meio de cultura é de 0,3 pg/ml para a IL-1 β , 3pg/ml para a IL-6 e 4,4 pg/ml para o TNF- α .

3.6 ANÁLISE DA SÍNTESE DE PGE2

PGE2 foi medido nos sobrenadantes do meio de cultura usando-se o kit de Imunoteste PGE2 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI EUA). Este teste é baseado na competição entre PGE2 e um conjugado PGE2-acetilcolinesterase (Marcador PGE2) para uma quantidade limitada de anticorpo monoclonal PGE2 (SHI et al., 2002).

Todas as reações foram medidas em um micro-ELISA Vmax fotômetro (Molecular Devices Corp., Menlo Park, Ca, EUA). Os valores foram expressos em ng/g de tecido fresco (ng/g w.w.) para IL-6 e PGE2 e pg/g de tecido (pg/g. w.w.) para IL-1 β e TNF- α .

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Valores médios e erros padrões foram calculados e a análise estatística feita usando-se o teste u de Mann-Whitney. Valores de P iguais ou menores que 0,05 foram considerados significativos. Um programa de computador InStat 2.1 (GraphPads Inc, La Jolla, CA, EUA) instalado em um sistema PowerPC® Macintosh 7200/120 (MacWarehouse, Toronto, Canadá) foi utilizado para calcular as médias e erros-padrão.

4 RESULTADOS

4.1 PRODUÇÃO DOS DIFERENTES MEDIADORES DE INFLAMAÇÃO NOS EXPLANTES DE MEMBRANA

Experiências preliminares foram feitas usando-se explantes de membranas da interface de próteses soltas, e o nível dos mediadores inflamatórios em no meio de cultura foi analisado. Nenhuma diferença significativa foi observada entre culturas em duplicata usando-se espécimes do mesmo paciente. Os níveis de citocina em vários períodos de incubação também foram medidos e o período ideal de incubação foi de 72 horas.

Nós examinamos no início o nível de citocinas e de PGE2 nos espécimes de membrana da interface. As membranas produziram IL-1 β , IL-6, TNF- α e PGE2. A produção de citocinas e de PGE2 variou de maneira considerável entre os pacientes. A síntese de IL-1 β ($194,72 \pm 52,47$ pg/g. w.w.; média \pm erro padrão) e TNF- α ($4,04 \pm 0,70$ pg/g.w.w.; média \pm erro padrão) se situaram ao nível de picogramas, enquanto que os níveis de IL-6 ($183,34 \pm 110,04$ ng/g.w.w.; média \pm erro padrão) e de PGE2 ($791,53 \pm 310,99$ ng/g.w.w., média \pm erro padrão) se situaram ao nível de nanogramas.

A atividade enzimática média da estromelina foi de 87,01 U/g de tecido fresco (w.w.) nos explantes de membrana cultivados a 72 horas. O nível de atividade enzimática média para a collagenase foi de $26,98 \pm 3,54$ U/g de tecido fresco. A síntese de nitritos foi em média de 32,40 nmol/ml de meio de cultura testado nos explantes de membrana cultivados a 72 horas.

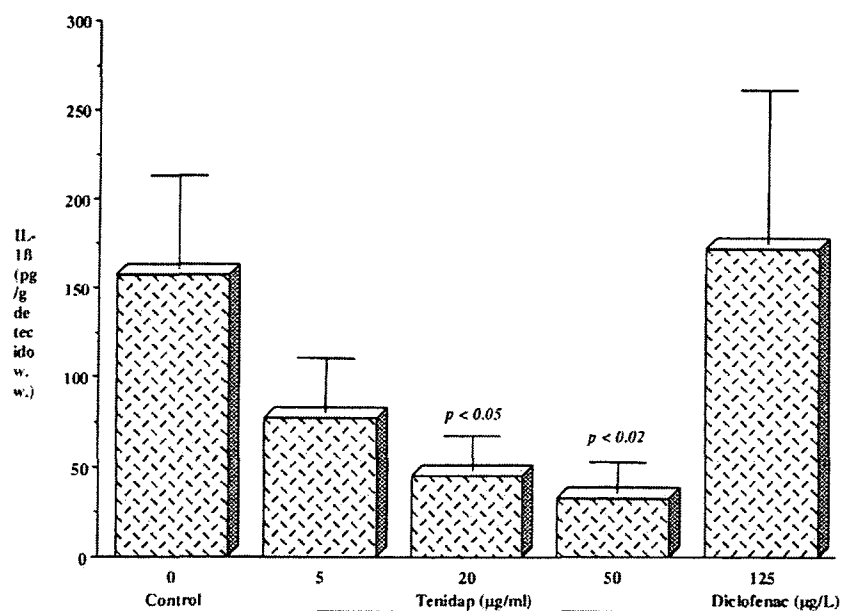
4.2 EFEITO DOS MEDICAMENTOS SOBRE A SÍNTESE DE CITOCINAS

4.2.1 Interleucina-1 β

IL-1 β foi detectada em todos os espécimes testados. Como mostrado na figura 3, uma diferença estatisticamente significativa na síntese de IL-1 β foi encontrada em duas concentrações de tenidap testadas. Uma inibição de 71,3% ($p < 0,05$) usando-se uma concentração terapêutica à 20 μ g/ml e uma inibição de 79,3% ($p < 0,02$) a uma concentração supratrapêutica de 50 μ g/ml. Embora tenhamos observado uma redução de 51% nos níveis de IL-1 β nos espécimes tratados com tenidap a 5 μ g/ml, esta redução não foi estatisticamente

significativa com relação ao controle não tratado. O tratamento com diclofenaco a 125µg/ml não apresentou um efeito significativo de inibição da síntese de IL-1β (figura 3).

FIGURA 3 – EFEITO IN VITRO DE TENIDAP E DICLOFENACO NOS NÍVEIS DE IL-1β

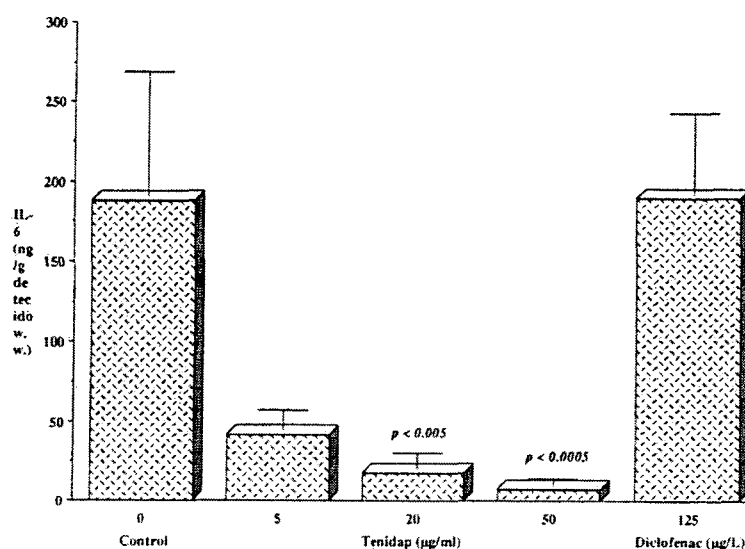


4.2.2 Interleucina-6

A síntese de IL-6 foi muito mais elevada nos explantes que as outras suas citocinas estudadas (IL-1β e TNF-α). Nossos resultados demonstraram que o tenidap, mesmo em concentrações subterapêuticas de 5µg/ml, reduziu em 77,5% a produção de IL-6, embora não de maneira significativa com relação ao controle não tratado (figura 4). A redução foi estatisticamente significativa nas outras duas concentrações testadas. O tenidap diminuiu a síntese de IL-6 em 90,4% ($p < 0,005$) e 96% ($p < 0,05$) em concentrações de 20µg/ml e 50µg/ml, respectivamente.

O tratamento com diclofenaco a 125µg/ml não alterou de maneira significativa a síntese de IL-6 (figura 4).

FIGURA 4 – EFEITO IN VITRO DE TENIDAP E DICLOFENACO NOS NÍVEIS DE IL-6

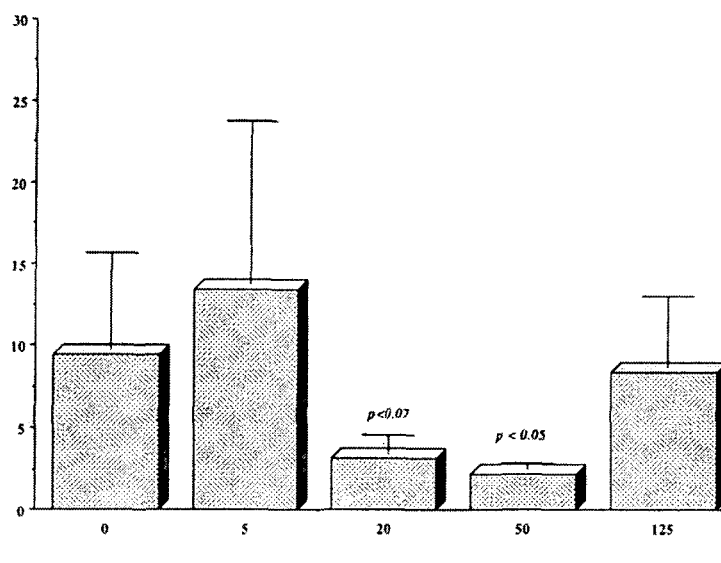


4.2.3 TNF- α

A detecção de TNF- α só foi possível usando-se um kit ELISA de alta sensibilidade. Os níveis de TNF- α foram relativamente baixos se comparados com as outras duas citocinas (IL-1 β e IL-6). O nível de IL-6 nos espécimes tratados com tenidap a 5 µg/ml permaneceram semelhantes ao controle. Em presença do tenidap, a redução da síntese de TNF- α foi de 66,9% ($p=NS$) e 77,4% ($p<0,05$) a concentrações de 20 µg/ml e 50 µg/ml, respectivamente (figura 5).

Mais uma vez, o diclofenaco a 125 µg/ml não alterou de maneira significativa os níveis de TNF- α com relação ao controle não tratado (figura 5).

FIGURA 5 – EFEITO IN VITRO DE TENIDAP E DICLOFENACO NOS NÍVEIS DE TNF- α

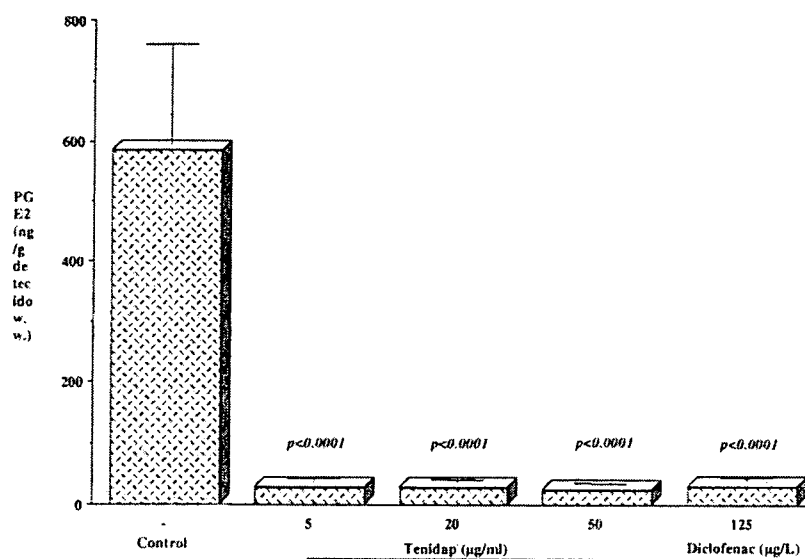


4.2.4 Efeito dos medicamentos sobre a síntese de PGE2

Um nível elevado de PGE2 estava presente em todas as membranas testadas. O tenidap produziu um efeito inibidor importante e extremamente significativo sobre a síntese de PGE2 nas três concentrações testadas (5 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$ e 50 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente). Uma inibição acima de 90% ($p < 0,0001$) foi observada em todos os tecidos analisados (figura 6).

Como era esperado, o diclofenaco inibiu de maneira extremamente significativa ($p < 0,0001$) e acima de 95% a síntese de PGE2 pelos tecidos em cultura (figura 6).

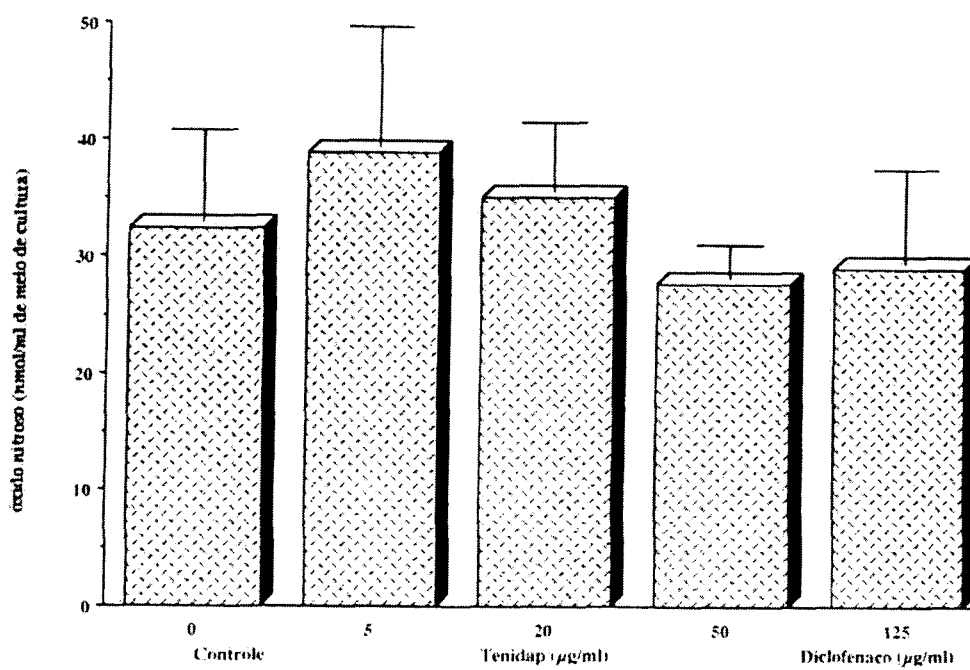
FIGURA 6 – EFEITO IN VITRO DE TENIDAP E DICLOFENACO NOS NÍVEIS DE PEG2



4.2.5 Efeito dos medicamentos sobre a síntese de NO

Apesar de uma diminuição nominal dos níveis de NO, nenhuma diferença significativa foi observada entre o grupo controle e os grupos tratados com tenidap ou diclofenaco. O nível de expressão basal de NO foi de $32,40 \pm 12,2$ nmol/ml. A redução máxima de síntese foi observada a $50 \mu\text{g/ml}$ de tenidap, com os níveis diminuindo a $27,63 \pm 12,8$ nmol/ml. Esta diminuição não foi estatisticamente significativa. O diclofenaco também não inibiu a síntese de NO de maneira significativa ($29,04$ nmol/ml) se comparada ao grupo controle (figura 7).

FIGURA 7 – EFEITO IN VITRO DO TENIDAP E DO DICLOFENACO NA SÍNTESE DE NO



4.2.6 Efeito dos medicamentos sobre a atividade das MMP

4.2.6.1 Colagenase-1

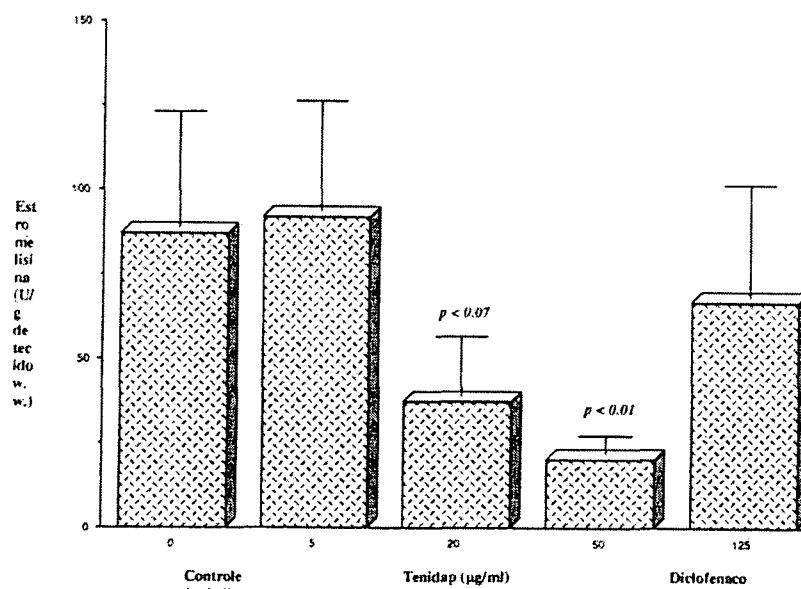
Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre o grupo controle, os grupos tratados com tenidap e o grupo tratado com diclofenaco (dados não mostrados).

4.2.6.2 Estromelisina

Nossos resultados demonstraram que o tenidap em concentrações subterapêuticas de 5 µg/ml, não reduziu a atividade enzimática da estromelisina. O tenidap diminuiu a atividade enzimática da estromelisina em 57,1% ($p < 0,07$) e 76,6% ($p < 0,01$) em concentrações de 20 µg/ml e 50 µg/ml, respectivamente. A redução foi estatisticamente significativa a 50 µg/ml e com uma tendência estatística muito forte a 20 µg/ml (figura 8).

O tratamento com diclofenaco a 125µg/ml não alterou de maneira significativa a atividade enzimática da estromelisina (figura 8).

FIGURA 8 – EFEITO IN VITRO DE TENIDAP E DICLOFENACO NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA ESTROMELISINA



5 DISCUSSÃO

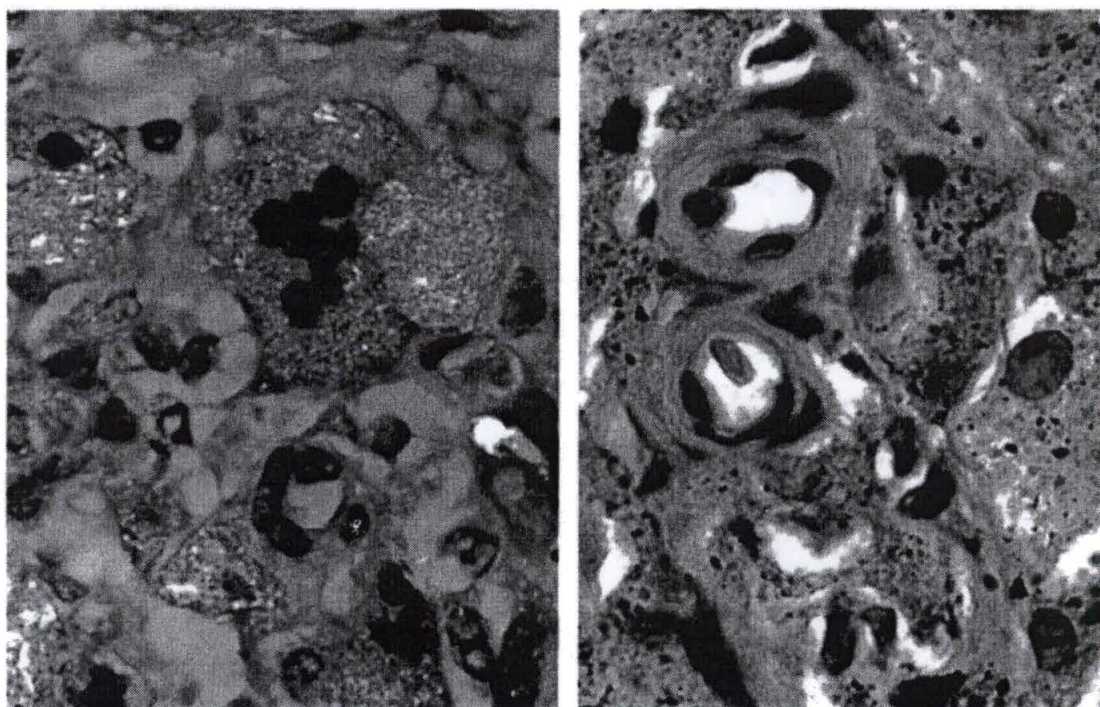
5.1 PRODUÇÃO DE PARTÍCULAS CAUSADAS PELO DESGASTE DO IMPLANTE

Quando duas superfícies deslizam uma sobre a outra, a produção de partículas de uma ou de ambas as superfícies é inevitável. Devido ao fato que as arthroplastias totais de quadril permitem ao paciente uma mobilidade articular ilimitada e indolor, a produção de partículas é esperada. O volume de desgaste depende em parte da distância que as superfícies deslizam uma sobre a outra. SHANBHAG e RUBASH em 1994 determinaram a superfície sujeita a desgaste após uma ATQ (SHANBHAG et al., 1994). Cada passo produz uma excursão de cerca de 2cm entre a cabeça femoral e a inserção de UHMWPE. Se estimarmos um total de 1 milhão de passos por ano num indivíduo normal e um implante com uma cabeça de 28mm de diâmetro, cerca de 2463 m² de superfície total se move uma contra a outra. Isto é aproximadamente a área de sete quadras de basquetebol. Além disso, dada uma mobilidade de 90° de flexão, em 1 ano a cabeça femoral se move uma distância linear de 22 km dentro do componente acetabular. Estas áreas e distâncias representam a magnitude das superfícies susceptíveis ao desgaste nas ATQ.

Ao redor das ATQ, partículas podem se formar a partir de várias fontes (figura 9). A principal partícula identificada em lesões osteolíticas e em membranas de interface, representando de 70% a 95% do volume total, são partículas de UHMWPE (FRIEDMAN et al., 1993; MALONEY et al., 1995; SHANBHAG et al., 1994b). Sua origem é da superfície articular da inserção acetabular composta de UHMWPE. As partículas de UHMWPE presentes ao redor dos componentes femorais não cimentados com soltura foram analisados por vários autores (CAMPBELL et al., 1995; HORIKOSHI et al., 1994; MALONEY et al., 1995; MARGEVICIUS et al., 1994; SHANBHAG et al., 1994b). Estas partículas eram predominantemente esféricas e de 100µm a 2mm de diâmetro. Também foram encontradas fibrilas interconectadas com as partículas esféricas, formando assim agregados maiores (CAMPBELL et al., 1995; MALONEY et al., 1995; SHANBHAG et al., 1994b). O desgaste também ocorre na superfície convexa, não articular, da inserção acetabular em UHMWPE devido ao movimento desta contra a cúpula metálica (DOEHRING et al., 1996; HUK et al., 1994; SHANBHAG et al., 1996) e contra a o rebordo dos buracos dos parafusos. Buracos não preenchidos na cúpula metálica tornam-se depósitos de partículas geradas nas superfícies não articulares, e eles podem abrigar partículas que migram da superfície articular pela

rebordo do componente (HUK et al., 1994; MACAULAY et al., 1996; SHANBHAG et al., 1995). Estas partículas de UHMWPE nos buracos da cúpula metálica são maiores que aquelas presentes ao redor da haste femoral (SHANBHAG et al., 1995). Buracos não preenchidos também permitem acesso à parte posterior da cúpula, potencialmente aumentando a incidência de osteólise pélvica observada em radiologia (MALONEY et al., 1993), em autópsias (URBAN et al., 1996) e em modelos de ATQ em cães (MACAULAY et al., 1996). Parafusos metálicos, que permitem maior estabilidade inicial às cúpulas, podem ser uma fonte de atrito e corrosão originando partículas de metal ou de UHMWPE.

FIGURA 9 - FOTOMICROGRAFIA DE MEMBRANA DE INTERFACE RETIRADA DE PRÓTESE TOTAL DE QUADRIL SOLTA SEM CIMENTO (À ESQUERDA) E CIMENTADA (À DIREITA). NUMEROSAS PARTÍCULAS BIREFRINGENTES DE TAMANHO SUBMICRON, PROVAVELMENTE POLIETILENO, SÃO VISÍVEIS EM LUZ POLARIZADA (À ESQUERDA). NUMEROSAS PARTÍCULAS METÁLICAS ESCURAS INTRACELULARES SÃO BEM VISUALIZADAS À DIREITA (X50)



No componente femoral, partículas metálicas representam apenas uma fração do volume total e tipicamente resultam da abrasão da haste contra o osso ou cimento (MALONEY et al., 1995; SHANBHAG et al., 1995). Outra fonte importante de partículas metálicas é a

junção da cabeça modular com o colo. A cabeça não é rigidamente fixada, permitindo desgaste por atrito e criando uma fissura que gera produtos de corrosão (COLLIER et al., 1992; GILBERT et al., 1993; MEVELLEC et al., 1996). Estes produtos da corrosão podem ser fragmentos de vários componentes oxidados, tais como ortofosfato de cromo (JACOBS et al., 1995b; URBAN et al., 1994). Uma fonte pouco comum de partículas é a que resulta do polimento da haste (MERCHANT et al., 1995). Partículas metálicas podem causar uma resposta celular particularmente agressiva (GLANT et al., 1993; HAYNES et al., 1993; JACOBS et al., 1995b; SHANBHAG et al., 1994c). É de maior importância a consequência destas partículas entre a cabeça femoral e a inserção de UHMWPE, pois isso induz um desgaste por interposição, acelerando assim a produção de partículas de UHMWPE.

5.2 RESPOSTA INFLAMATÓRIA ÀS PARTÍCULAS DE DESGASTE DOS COMPONENTES

O tecido fibroso na interface osso-cimento ou osso-prótese tem sido sempre associado a osteólise e à soltura dos componentes. Estudos histológicos destas membranas evidenciaram a biocompatibilidade do implante como um todo e dos materiais utilizados (CHARNLEY et al., 1964; CHARNLEY et al., 1970; VERNON-ROBERTS et al., 1976; WILLERT et al., 1974). Além disso, quando membranas foram associadas com soltura asséptica e se encontraram substituindo o osso reabsorvido, elas eram também depósitos de partículas de desgaste, histiócitos, células gigantes multinucleares a corpo estranho, fibroblastos e alguns linfócitos (DiCARLO et al., 1992; FOREST et al., 1991; HOWIE et al., 1990; MIRRA et al., 1976; VERNON-ROBERTS et al., 1976; WILLERT et al., 1976). Para compreender os mecanismos que levam à osteólise e à soltura, nada mais lógico que estudar em detalhes o perfil bioquímico e imunológico deste tecido de interposição.

GOLDRING et al., em 1983 foram um dos primeiros a demonstrar que a membrana da interface encontrada em ATQ soltas eram comparáveis à membrana sinovial reumatóide (GOLDRING et al., 1983). Eles demonstraram também que quando esses tecidos eram colocados em cultura, os histiócitos e os macrófagos que aí estavam liberavam grandes quantidades de collagenase e de PGE₂ no meio de cultura (GOLDRING et al., 1983; GOLDRING et al., 1986). Esta foi uma descoberta importante, pois já era sabido que o PGE₂ tem a capacidade de estimular a reabsorção osteoclástica do osso e que a collagenase pode degradar a matriz osteóide orgânica. Este achado também sugere que as membranas da interface que contêm as partículas e as células fagocitárias, em vez de serem um apêndice

inofensivo, na verdade participam ativamente da perda óssea local a ponto de induzir e causar a soltura do componente.

GOODMAN et al., em 1989 analisaram a liberação de PGE2 pela membranas encontradas em volta de próteses soltas e estáveis (GOODMAN et al., 1989). Eles relataram que os tecidos ao redor de componentes soltos apresentavam níveis de PGE2 mais altos que aqueles ao redor de componentes estáveis. Esta descoberta, associada à descoberta de IL-1 β por outros autores (THORNHILL et al., 1990), sugeriram que PGE2 e IL-1 β estavam intimamente associados à osteólise ao redor de componentes soltos (GOODMAN et al., 1989). DORR et al., em 1990 relataram que, embora as membranas da interface de componentes soltos liberassem níveis elevados de IL-1 β , PGE2 e colagenase, não havia diferença entre componentes de liga de titânio ou de cromo-cobalto (DORR et al., 1990).

KIM et al., em 1993 analisaram o espectro de citocinas e mediadores de osteólise (estromelina, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α , e PGE2) e sugeriram que poucas diferenças existiam entre os tecidos periprotéticos de próteses cimentadas e não cimentadas (KIM et al., 1993). Sem surpresas, a presença de partículas de UHMWPE estava associada com níveis mais elevados de mediadores de inflamação como a colagenase e IL-1 (KIM et al., 1994).

SHANBAG et al., em 1995 compararam os níveis de diversas citocinas pró e antiinflamatórias liberadas pela membrana ao redor de componentes não-cimentados soltos, bem como de tecidos capsulares associados a fraturas do colo do fêmur e de autópsias (SHANBAG et al., 1995). Eles sugeriram que os tecidos periprotéticos representam uma situação de desequilíbrio bioquímico, onde os mediadores iniciam e mantêm o processo inflamatório que não pode mais ser regulado pelos mediadores anti-inflamatórios. Este desequilíbrio resultaria da estimulação constante das células fagocitárias pelas partículas oriundas do desgaste.

Enquanto que os estudos precedentes determinaram os níveis de vários mediadores bioquímicos importantes, JIRANEK et al., em 1993 utilizaram técnicas de hibridização *in situ* para detectar a origem das citocinas em componentes acetabulares soltos (JIRANEK et al., 1993). Eles detectaram a proteína IL-1 β em macrófagos e fibroblastos, mas o ARNm para IL-1 β foi encontrado apenas nos macrófagos. Além disso, usando técnicas de RT-PCR, GLANT et al., demonstraram em 1994 que as células das membranas da interface têm uma capacidade latente elevada para exprimir o gen que codifica a IL-1 α em resposta a uma mudança no microambiente (GLANT et al., 1994). Estes estudos definiram claramente que vários processos e mediadores bioquímicos que participam do processo inflamatório ao redor de componentes soltos. Visto que os tecidos periprotéticos geralmente contêm uma grande

variedade de tamanhos e composição de partículas, não foi possível determinar quais partículas estavam primariamente envolvidas na estimulação dos macrófagos. Estes detalhes necessitaram o desenvolvimento de modelos *in vitro* onde os macrófagos interagindo com as partículas poderiam ser estudados sistematicamente.

5.3 ANÁLISE DA INTERAÇÃO PARTÍCULAS-MACRÓFAGOS

A cultura *in vitro* de macrófagos com partículas oriundas do desgaste de ATQ tem sido usada como um modelo para estudar a sequência de eventos que ocorrem na interface osso-implante. Experiências *in vitro* com macrófagos e partículas permitiram o estudo de diversas variáveis individualmente, sem interações de fatores imprevistos.

Linhagens celulares de macrófagos imortalizados, tais como P388D1, J774, IC-21 e RAW 267, têm sido usadas extensivamente para estudar as interações entre os macrófagos e as partículas (GLANT et al., 1993; HOROWITZ et al., 1988; HOROWITZ et al., 1991; MACAULAY et al., 1995; RAE et al., 1975; SCHINDLER et al., 1990; SHANBHAG et al., 1994c). Vários pesquisadores utilizaram macrófagos de camundongos (GARRET et al., 1983; GLANT et al., 1994b) e mais recentemente, monócitos do sangue periférico de voluntários humanos (SHANBHAG et al., 1995b) e células mononucleares isoladas das membranas da interface (LEE et al., 1997).

SHANBHAG et al., em 1994/95 demonstraram que a morte celular aumentava com doses mais elevadas de partículas (SHANBHAG et al., 1994c; SHANBHAG et al., 1995b). Macrófagos P388D1 em cultura com partículas de titânio por 24 horas quase não foram afetadas pela concentração de partículas que correspondiam a um décimo da superfície celular total. No entanto, um aumento de dez vezes na concentração de partículas resultou na diminuição em 50% da incorporação de timidina comparado a controles não estimulados. Um aumento de cem vezes na concentração de partículas, representando dez vezes a área total das células, praticamente aboliu a síntese de ADN. Este efeito citotóxico também é dependente da composição das partículas, visto que partículas de poliestireno em concentrações semelhantes não foram tão tóxicas (SHANBHAG et al., 1994c).

Além dos efeitos citotóxicos, RAE et al demonstraram que os macrófagos expostos a partículas de liga de cromo-cobalto podem ser estimulados a liberar enzimas lisossomiais tais como a β -glucuronidase e a N-acetil- β -D-glucose aminidase (RAE et al., 1986). GLANT et al., em 1993/94 relataram que macrófagos P388D1 expostos a partículas de PMMA e titânio liberavam PGE2 e IL-1 no meio de cultura (GLANT et al., 1993; GLANT et al., 1994b). A

liberação de PGE2, IL-1 ou TNF- α era consistente em todas as linhagens de macrófagos estudados (HOROWITZ et al., 1988). De acordo com esses estudos, HOROWITZ et al., em 1991 cultivaram macrófagos P388D1 com partículas de PMMA e mediram a liberação de metabólitos do ácido araquidônico (PGE1 e PGE2) (HOROWITZ et al., 1991). PGE1, PGE2 e IL-1 são estimuladores da reabsorção óssea e o meio de cultura condicionado a partir dessa interação entre os macrófagos e as partículas também apresentou esta característica de induzir a reabsorção óssea em um modelo de calvária de rato (GLANT et al., 1993; GLANT et al., 1994b; SHANBHAG et al., 1994c).

Além da resposta dos macrófagos baseada na composição e na dosagem das partículas, o tamanho dessas partículas pode influenciar fortemente a liberação de mediadores inflamatórios (GELB et al., 1994; HOROWITZ et al., 1993; SHANBHAG et al., 1994c). HOROWITZ et al., demonstraram em 1993 que partículas de PMMA pequenas o suficiente para serem fagocitadas (cerca de 7 μ m ou menos) vão estimular a liberação de TNF- α pelos macrófagos, enquanto que partículas maiores não são estimulatórias (HOROWITZ et al., 1993). Dentro de um espectro fagocitável, parece haver uma capacidade distinta de liberação de citocinas dependendo da distribuição dos diferentes tamanhos. Partículas menores parecem ser mais responsáveis pelo processo osteolítico que partículas maiores (DiCARLO et al., 1992; FOREST et al., 1991; GELB et al., 1994; HOROWITZ et al., 1993; VERNON-ROBERTS et al., 1996; WILLERT et al., 1976).

Usando partículas de Cobalto-Crômio e de Titânio de tamanhos semelhantes, HAYNES et al., em 1993 estudaram a capacidade de estimular macrófagos peritoneais de ratos a liberar mediadores da inflamação (HAYNES et al., 1993). Eles descobriram que as partículas de Crômio-Cobalto eram muito tóxicas e causavam a morte celular, com pouca ou nenhuma liberação de citocinas. No entanto, partículas de titânio eram menos tóxicas e induziam a síntese e a liberação de níveis elevados de vários mediadores como PGE2, IL-1, IL-6 e TNF- α (HAYNES et al., 1993). SHANBHAG et al., em 1995 estudaram a capacidade de estimulação de partículas de titânio, partículas de UHMWPE recuperadas de membranas da interface, e partículas de UHMWPE fabricadas em laboratório (SHANBHAG et al., 1995b). Consistente com estudos anteriores de HAYNES et al., em 1993, as partículas de titânio foram as que mais estimularam PGE2, IL-1 α , IL-1 β e IL-6 pelos monócitos (HAYNES et al., 1993). Por outro lado, ambas as partículas de UHMWPE estimularam menos que o titânio e mais que os controles não estimulados. As partículas de titânio não apenas ocasionaram uma liberação mais acentuada de citocinas mas também aumentaram a reabsorção óssea em um modelo de calvária de camundongo e a proliferação de fibroblastos da derme humana (SHANBHAG et

al., 1997b). Estes achados colocaram em relevo as diversas funções que os macrófagos assumem ao controlar a osteólise e a fibrogênese que ocorre na interface osso-implante. Estudos mais recentes documentaram que os macrófagos, quando estimulados com partículas, podem também sintetizar óxido nítrico (NO), além dos mediadores mais tradicionais (MACAULAY et al., 1995). Devido ao fato que o NO é um radical livre omnipresente com muitas funções fisiológicas, a sua liberação pode acrescentar uma complexidade extra à compreensão das interações entre as partículas e os macrófagos.

5.4 ANÁLISE DA INTERAÇÃO PARTÍCULAS-FIBROBLASTOS

Os fibroblastos também podem ser importantes mediadores da perda óssea periprotética. MALONEY et al., em 1993 relataram que uma concentração baixa de partículas de titânio estimulam a proliferação fibroblástica (MALONEY et al., 1993). YAO et al., em 1995 observaram que as partículas de titânio podem estimular diretamente os fibroblastos a produzir níveis elevados de colagenase e de estromelina (YAO et al., 1995) ao nível de ARNm e da proteína. Estes enzimas estão relacionadas à degradação da matriz orgânica do osso. Além disso, YAO et al., em 1997 demonstraram que fibroblastos estimulados com partículas de titânio liberam fatores que suprimem a síntese de colágeno pelos osteoblastos (YAO et al., 1997). Coletivamente, diferentes tipos celulares presentes nos tecidos granulomatosos periprotéticos produzem vários mediadores celulares com funções autócrinas e parácrinas. Este efeito autócrino-parácrino pode resultar na ativação de macrófagos e osteoclastos e induzir a reabsorção do osso adjacente. Finalmente, pode-se especular que a fibrose reacional estimulada por partículas de várias origens, tamanhos e dosagens possa ser um fator complicador para se obter uma boa aposição ósea ou um crescimento ósseo em superfícies texturizadas ou porosas (GOODMAN et al., 1996; SHANBHAG et al., 1997).

5.5 TRATAMENTO DA OSTEOLISE NA ATQ

Como se viu no texto acima, um dos fatores limitantes da longevidade das ATQ é a osteólise e a soltura dos componentes que a acompanha. A presença de osteólise nas radiografias representa uma ameaça constante à sobrevida do implante. Regra geral, uma vez a osteólise detectada, ela progride invariavelmente, a menos que um tratamento seja estabelecido. O tratamento atual é eminentemente cirúrgico, ou seja, a curetagem e o enxerto

das lesões onde não há soltura do componente e a substituição de componentes que produzem as partículas (SINHA et al., 1998). No caso de componentes soltos, indica-se a ou a revisão por meio de técnicas cirúrgicas diversas que podem ser extremamente complexas (SINHA et al., 1988).

A compreensão da fisiopatologia da osteólise e a identificação de moduladores da cascata inflamatória que acompanha a presença de partículas na interface osso-prótese abriu as portas mais recentemente ao tratamento farmacológico da osteólise (BLAINE et al., 1997). Ainda que em caráter experimental, estas pesquisas demonstram que uma nova era na prevenção e no tratamento da osteólise esta começando.

BLAINE et al., em 1997 estudaram vários agentes farmacológicos *in vitro* em macrófagos estimulados com partículas de titânio. Eles relataram que PGE1 e PGE2 eram inibidores potentes da síntese de TNF- α , mas eram estimuladores da citocina inflamatória IL-6. Por outro lado, a indometacina aumentou o efeito estimulador das partículas de titânio na síntese de TNF- α , resultando num aumento 3 maior dos níveis desta citocina. Inibidores da fosfodiesterase, como a isobutirimetilxantina e a pentoxifilina, que aumentam os níveis intracelulares de AMPc, causaram uma diminuição na produção de TNF- α , mas um aumento na produção de IL-6. Por outro lado, ao antibiótico fluoroquinolona ciprofloxacina, que também é um inibidor da fosfodiesterase, causou uma inibição dose-dependente da síntese de TNF- α e de IL-6, sugerindo que a supressão da síntese de IL-6 é independente do AMPc (BLAINE et al., 1997).

SHANBHAG et al., em 1997 avaliaram a eficácia da terapia usando bifosfonados (um medicamento usado no tratamento da osteoporose) para inibir a osteólise induzida por partículas em um modelo de ATQ em cães. A utilização contínua de alendronato por 24 semanas inibiu a osteólise encontrada no grupo controle não tratado. Este resultado indica que a incorporação de alendronato à matriz mineralizada a torna refratária à reabsorção osteoclástica (SHANBHAG et al., 1997) e poderia ser usada clinicamente como tratamento preventivo ou terapêutico. MILLET et al., em 2002 também utilizaram alendronato em um modelo de osteólise a partir de partículas de UHMWPE implantadas na tíbia do rato. Neste estudo de 4 semanas, o alendronato impediu a aparição da osteólise se utilizado profilaticamente e impediu a progressão da osteólise se utilizado após o início do processo patológico (MILLET et al., 2002)

ZHANG et al., em 2001 implantaram partículas de titânio na calvária de camundongos e observaram o efeito do tratamento com celecoxib (inibidor seletivo e específico da COX-2) em camundongos transgênicos que não exprimiam ou a COX-1 (COX-1^{-/-}) ou a COX-2

(COX-2-/-). Camundongos tratados com celecoxib e camundongos COX-2 -/- desenvolveram uma resposta inflamatória e osteoclastogênica muito menor que os camundongos não tratados (ZHANG et al., 2001).

POLLICE et al., em 2001 utilizaram pentoxifilina (um inibidor de TNF- α usado por mais de vinte anos no tratamento de doenças vasculares periféricas) para inibir macrófagos estimulados com partículas de UHMWPE. Eles demonstraram o potencial terapêutico deste medicamento ao inibirem fortemente a secreção de TNF- α pelos macrófagos estimulados (POLLICE et al., 2001).

CHILDS et al., em 2001 estudaram o efeito do etanercept, um inibidor solúvel de TNF- α usado no tratamento de artrite reumatóide, em modelos de osteólise in vitro e in vivo. In vitro, o medicamento inibiu a reabsorção mediada por osteoclastos da matriz óssea em cultura, bem como a produção de citocinas pelos macrófagos estimulados por partículas de titânio (CHILDS et al., 2001). Usando um modelo de estimulação de osteólise com partículas de titânio no rato, o medicamento preveniu o aparecimento de osteólise e manteve o número de osteoclastos no mesmo nível que o controle não estimulado. Por fim, a utilização do etanercept cinco dias após o início do processo de osteólise impediu a progressão das lesões já existentes (CHILDS et al., 2001).

GOATER et al., em 2002 propuseram a utilização da terapia gênica para prevenir o aparecimento de osteólise. Eles demonstraram o potencial de fibroblastos transfectados com o gene da osteoprotegerina (um inibidor natural da diferenciação dos osteoclastos) em impedir o aparecimento de osteólise induzida por partículas de UHMWPE em um modelo de calvária de rato (GOATER et al., 2002).

5.6 EFEITO DOS MEDICAMENTOS EXPERIMENTAIS NO PRESENTE ESTUDO

5.6.1 Efeito sobre as citocinas e prostaglandinas

Neste estudo, tanto o diclofenaco quanto o tenidap tiveram um efeito inibidor extremamente importante (acima de 90%) na síntese de PGE₂ em todas as concentrações testadas. Como o PGE₂ é um promotor da reabsorção óssea e do recrutamento de osteoclastos em doses elevadas, sua inibição isolada em princípio teria efeitos benéficos sobre a evolução da patologia (DORR et al., 1990; GOLDRING et al., 1983; SHANBHAG et al., 1995). No entanto, a inibição de apenas um dos fatores da cascata inflamatória causa a transferência do mecanismo em direção a outros moduladores da inflamação, sem que um

efeito inibidor final seja alcançado (BLAINE et al., 1997). Além disso, a experiência clínica tem demonstrado que os AINS de utilização corrente na prática médica não inibem a progressão da osteólise. Alguns, como a indometacina, utilizada freqüentemente para prevenir o aparecimento de ossificação heterotópica após uma ATQ, podem potencialmente estimular a progressão da osteólise (BLAINE et al., 1997).

O tenidap teve um efeito inibidor significativo na síntese de citocinas nas três concentrações testadas. Esta inibição variou de 67% a 90%, dependendo da citocina em questão e correspondeu a um efeito dose-dependente. Tanto a interleucina-1 β , a interleucina-6 quanto o fator de necrose tumoral- α são potentes estimuladores da osteólise. A inibição de IL-1 β tem implicações na diminuição da síntese de metaloproteinases e de prostaglandinas (GOODMAN et al., 1989; DORR et al., 1990; KIM et al., 1993). Isto implica numa diminuição da digestão da matriz e de uma menor exposição da superfície osteóide à reabsorção mediada por osteoclastos. O tenidap inibe igualmente a produção de IL-1 nos macrófagos peritoniais de camundongo estimulados pelo LPS e pelo Zymosan (PELLETIER et al., 1993a). Na mesma concentração, ele inibe também a síntese de leucotrieno (LITTMAN et al., 1990). Uma redução da síntese de IL-1 e/ou de TNF- α é plausível *in vivo* tendo em vista os estudos já citados. Além do mais, a capacidade do tenidap de reduzir o nível do receptor de IL-1 do condrócito (PELLETIER et al., 1993a) poderia ser um mecanismo adicional da ação deste medicamento. Este efeito do tenidap não parece ser o resultado de uma inibição geral da síntese de proteínas. A ausência de efeito da droga sobre a síntese do antagonista do receptor da IL-1 (IL-1ra) sugere que seu efeito sobre os receptores de IL-1 é relativamente seletivo. A possibilidade que o tenidap aja via uma inibição da expressão do gen do receptor da IL-1 foi recentemente sugerida (PELLETIER et al., 1993a).

A inibição dos níveis de IL-6 diminui a modulação da reabsorção óssea pelos osteoclastos (VARGAS et al., 1996). Como a expressão de IL-1 e TNF- α também pode ser inibida por IL-6 (SCHINDLER et al., 1990), este efeito paradoxal é extremamente importante no controle da osteólise, visto que níveis mais baixos de IL-6 na realidade poderiam aumentar a síntese das outras duas citocinas. Assim sendo, a inibição de IL-6 por um medicamento deve obrigatoriamente estar relacionada com a inibição direta das outras suas citocinas pelo mesmo medicamento. A inibição da síntese de IL-6 também poderia estar relacionada indiretamente com a diminuição observada de PGE₂ neste estudo, que induz a síntese de IL-6 através da proteína quinase-c (KOZAWA et al., 1998). Este mecanismo não parece ser o mais importante nesta patologia, visto que a inibição extremamente significativa de PGE₂ pelo diclofenaco não causou uma diminuição concomitante de IL-6 em nosso estudo.

A inibição do TNF- α observada neste estudo tem implicações importantes no controle da osteólise induzida por partículas. Vários autores demonstraram que esta citocina, quando estudada de maneira isolada, representa o fator mais importante no controle da reabsorção óssea ao nível do recrutamento de precursores de osteoclastos (CLOHISY et al., 2002), da ativação de osteoclastos pré-existentes (FULLER et al., 2002), da proliferação de fibroblastos e da formação de tecido fibroso (SCHWARZ et al., 2000). Assim sendo, o efeito extremamente significativo do tenidap nesta citocina tem o potencial de inibir o mecanismo mais importante da osteólise induzida por partículas.

5.6.2 Efeito dos medicamentos sobre o óxido nítrico

De maneira interessante, os níveis de óxido nítrico não foram diminuídos de maneira significativa pelo tratamento com tenidap ou diclofenaco. Este fato é de muito interesse, visto que as citocinas são indutores da expressão de NO no osso e que níveis elevados de NO inibem a reabsorção óssea, enquanto que níveis baixos aumentam a reabsorção óssea (efeito bifásico do NO no metabolismo ósseo) (RALSTON et al., 1995). O efeito das citocinas na reabsorção óssea é determinado por um equilíbrio entre os níveis de NO e de PGE₂; concentrações elevadas de NO inibem a reabsorção óssea e antagonizam os efeitos de PGE₂, enquanto que concentrações muito baixas atuam em sinergia com as prostaglandinas para acelerar a reabsorção óssea (RALSTON et al., 1996). Este efeito pode ser melhor avaliado no caso da osteólise causada por partículas, onde IL-1 e TNF- α estão aumentadas, causando uma elevação nos níveis de NO que contrabalançam por sua vez o aumento de PGE₂. O fato que o tenidap não induziu uma diminuição significativa dos níveis de NO é extremamente positivo no contexto da inibição da reabsorção óssea.

5.6.3 Efeito dos medicamentos sobre a atividade das MMP

A supressão parcial da atividade das MMP pelo tenidap é provavelmente o reflexo de uma diminuição de sua síntese, tendo em vista a diminuição do conteúdo enzimático total. Vários mecanismos podem favorecer o aumento da síntese de MMP. Um dos candidatos seriam as citocinas, como a IL-1 e o TNF- α (PELLETIER et al., 1991). Neste modelo experimental, um nível elevado de IL-1 α e de IL-1 β foram encontrados ao nível da membrana da interface (GLANT et al., 1994). Estes resultados sugerem fortemente a implicação destas

citocinas na estimulação paracrina/autócrina da síntese de MMP. Esta hipótese parece ser ainda mais verdadeira tendo em conta que um estudo recente demonstrou que injeções intraarticulares de meio de cultura proveniente de monócitos aumentam a expressão *in vivo* de MMP na membrana sinovial e na cartilagem do cão (WOLF et al., 1993).

O tenidap poderia hipoteticamente diminuir a síntese das MMP pela sua ação inibidora sobre a síntese de IL-1 e secundariamente sobre a formação de complexos AP-1. Uma ação direta sobre a síntese ou a expressão dos oncogens/oncoproteínas é também possível. O tenidap poderia também afetar o processo de ativação das MMP ao diminuir a síntese dos ativadores fisiológicos possíveis, tais como o ativador do plasminogénio/plasmina, ou ao diminuir o nível dos inibidores tissulares das metaloproteases, o TIMP. A supressão da síntese das citocinas poderia igualmente diminuir o nível de ativação das MMP (PELLETIER et al., 1993a). O tenidap diminui de maneira marcante o nível de expressão (ARNm), tanto na cartilagem quanto na membrana sinovial, indicando uma ação deste medicamento ao nível transcricional (FERNANDES et al., 1998).

O tenidap parece ter uma ação inibidora sobre a síntese de várias proteínas responsáveis pela modulação do processo inflamatório (PELLETIER et al., 1993a). Foi demonstrado que o tenidap pode induzir uma redução no número de receptores de IL-1 nos condrócitos (PELLETIER et al., 1993a) e sinoviócitos. Esta redução produziria uma diminuição acentuada da estimulação da expressão das MMP e de sua síntese pelos macrófagos e fibroblastos quando estimulados pela IL-1 β .

A ausência de efeito inibidor do diclofenaco observada neste estudo sugere que a prevenção da reabsorção óssea com o tenidap não é devido a uma simples inibição da ciclo-oxigenase. A inibição pelo tenidap da IL-1 poderia ser mediada pela inibição da 5-lipoxigenase. Como já foi demonstrado, os inibidores da ciclo-oxigenase não inibem a síntese de IL-1 e esta propriedade seria uma distinção entre o tenidap e os outros AINS (ABRAMSON e WEISSMANN, 1989). Por exemplo, o ácido tiaprofênico e o naproxen, que têm a capacidade de reduzir a síntese das MMP, apresentam também certas propriedades de proteção da matriz extracelular (PELLETIER e MARTEL-PELLETIER, 1991; RATCLIFE et al., 1993).

Em suma, demonstrou-se neste estudo que os tecidos ao redor de próteses soltas devido à osteólise sintetizam níveis elevados de citocinas e prostaglandinas, além de metaloproteínas e óxido nítrico. A modulação ou inibição desta atividade inflamatória por

meios farmacológicos pode ter implicações no tratamento ou na prevenção da osteólise num futuro próximo.

6 CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou que o tenidap possui um efeito importante contra diversos moduladores inflamatórios da osteólise. O efeito protetor potencial *in vitro* do tenidap foi demonstrado em certas variáveis do processo patológico: a inibição de IL-1, de IL-6, de TNF- α e de PGE2. O tenidap apresenta igualmente um efeito de inibição acentuado sobre a atividade de pelo menos uma MMP neste estudo. Além disso, tenidap não inibiu a síntese de óxido nítrico, o que implica num efeito protetor adicional contra a osteólise. Estes resultados são interessantes devido à semelhança deste modelo *in vitro* com a patologia encontrada no paciente.

Os resultados de nosso estudo demonstram que, mesmo em presença de uma alteração mecânica como o desgaste de um implante ortopédico, a inibição da atividade dos moduladores inflamatórios, em um estágio precoce de evolução da doença, permitiria prevenir ou diminuir de maneira significativa a progressão da reabsorção óssea. Estas observações apoiam a hipótese da importância primordial da degradação enzimática das macromoléculas da matriz óssea orgânica e mineralizada na fisiopatologia da osteólise. Nossos resultados demonstram que o efeito osteoprotetor potencial do tenidap é mediado por uma inibição estatisticamente significativa da síntese de citocinas, PGE2 e de estromelina.

Finalmente, os resultados deste estudo sugerem igualmente que certos AINS não seletivos e não específicos COX-1/COX-2, como o diclofenaco, não possuem uma atividade de osteoproteção significativa.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABRAMSON, S.B.; WEISSMAN, G. Current comment: The mechanisms of action of nonsteroidal antiinflammatory drugs. **Arthritis Rheum.**, v. 32, p. 1-9, 1989.
- BECKENBAUGH, R.D.; ILSTRUP, D.M. Total hip arthroplasty. **J. Bone Joint Surg.**, v. 60A, p. 306-313, 1978.
- BLACKBURN Jr., W.D.; LOOSE, L.; HECK, L.W.; CHATHAM, W.W. Tenidap, in contrast to several available nonsteroidal antiinflammatory drugs, potently inhibits the release of activated neutrophil collagenase. **Arthritis Rheum.**, v. 34, p.211-217, 1991a.
- BLACKBURN Jr., W.D.; HECK, L.W.; LOOSE, L.; LOOSE, L.; ESKRA, J.D.; CARTY, T.J. Inhibition of 5-lipoxygenase product formation and polymorphonuclear cell degranulation by tenidap sodium in patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 34, p. 204-210, 1991b.
- BLAINE, T.A.; POLLICE, P.F.; ROSIER, R.N.; REYNOLDS, P.R.; PUZAS, J.E.; O'KEEFE, R.J. Modulation of the production of cytokines in titanium-stimulated human peripheral blood monocytes by pharmacological agents. The role of cAMP-mediated signaling mechanisms. **J. Bone Joint Surg. Am.**, v. 79, n 10, p.1519-28, 1997
- BROWN, G.C.; LOCKSHIN, M.D.; SALVATI, E.A.; BULLOUGH, P.G. Sensitivity to metal as a possible cause of sterile loosening after cobalt-chromium total hip-replacement arthroplasty. **J. Bone Joint Surg.**, v.59^A, p.164-168, 1977.
- BULLOUGH, P.G.; DICARLO, E.F.; HANSRAJ, K.K.; NEVES, M.C. Pathologic studies of total joint replacement. **Orthop. Clin. North Am.**, v. 19, p. 611-625, 1988.
- BURKE, D.W.; GATES, E.I.; HARRIS, W.H. Centrifugation as a method of improving tensile and fatigue properties of acrylic bone cement. **J. Bone Joint Surg.**, v. 66^A, p.1265-1273, 1984.
- CALDWELL, J.R.; KIRBY, D.S.; GARDNER, M.J.; HANSEN, R.A. The effects of age and gender on the pharmacokinetics of tenidap sodium in patients with rheumatoid arthritis and Osteoarthritis. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, supp. 1, v. 39, p. 3S-9S, 1995.
- CAMERON, H.U.; MCNEICE, G.M. A correlation of radiographic "modes of failure" with clinical failure of cemented stem-type femoral components. **Clin. Orthop.**, v.150, p.154-158, 1980.
- CAMPBELL, P.; MA, S.; YEOM, B.; MCKELLOP, H.A.; SCHMALZRIED, T.P.; AMSTUTZ, H.C. Isolation of predominantly submicron-sized UHMWPE wear particles from periprosthetic tissues. **J. Biomed. Mater Res.**, v. 29, p.127-131, 1995.

COLLIER, J.P.; SUPRENANT, V.A.; JENSEN, R.A.; MAYOR, M.B.; SUPRENANT, H.P. Corrosion between the components of modular femoral hip prostheses. **J. Bone Joint Surg.**, v.74B, p. 511–517, 1992.

CHARNLEY, J. Anchorage of the femoral head prosthesis to the shaft of the femur. **J. Bone Joint Surg.**, v. 42B, p. 28–30, 1960.

CHARNLEY, J. Arthroplasty of the hip. **Lancet**, v. (?), p.1129–1132, 1961.

CHARNLEY, J. The bonding of prostheses to bone by cement. **J. Bone Joint Surg.**, v. 46B, p.518–529, 1964.

CHARNLEY, J. Tissue reaction to implanted plastics. In: Charnley J, ed. **Acrylic Cement in Orthopedic Surgery**. Edinburgh: E & S Livingstone, 1970a, p.1–9.

CHARNLEY, J. The reaction of bone to self-curing acrylic cement. **J. Bone Joint Surg.**, v. 52B, p.340–353, 1970b.

CHARNLEY, J.; FOLACCI, F.M.; HAMMOND, B.T. The long-term reaction of bone to self-curing acrylic cement. **J. Bone Joint Surg.**, v.50B, p.822–829, 1968.

CHAVIRA Jr., R.; BURNETT, T.J.; HAGEMAN, J.H. Assaying proteínases with azocoll. **Anal Biochem.**, v. 136, p. 446-450, 1984

CHILDS, L.M.; GOATER, J.J.; O'KEEFE, R.J.; SCHWARZ, E.M. Efficacy of etanercept for wear debris-induced osteolysis. **J. Bone Miner Res.**, v.16, n. 2, p. 338-347, 2001

CLARK, I.M.; POWELL, L.K.; RAMSEY, B.; HAZLEMAN, B.L.; CAWSTON, T.E. The measurement of collagenase, tissue inhibitor of metalloproteínases (TIMP), and collagenase-TIMP complex in synovial fluids from patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 36, n. 3, p.372-379, 1993

CLOHISY, J.C.; TEITELBAUM, S.; CHEN, S.; ERDMANN, J.M.; ABU-AMER, Y. Tumor necrosis factor-alpha mediates polymethylmethacrylate particle-induced NF-kappaB activation in osteoclast precursor cells. **J. Orthop. Res.**, v. 20, n. 2, p. 174-181, 2002.

DEAN, D.D.; WOESSNER Jr, J.F. A sensitive, specific assay for tissue collagenase using telopeptide-free (3H) acetylated collagen. **Anal Biochem.**, v. 148, p.174-181, 1985

DEAN, D.D.; MARTEL-PELLETIER, J.; PELLETIER, J.P. et al. Evidence for metalloproteínase and metalloproteínase inhibitor (TIMP) imbalance in human osteoarthritic cartilage. **J. Clin. Invest.**, v. 84, p. 678-685, 1989.

DEAN, D.D.; SCHWARZ, Z.; BLANCHARD, C.R.; LIU, Y.; AGRAWAL, C.M.; LOHMANN, C.H.; SYLVIA, V.L.; BOYAN, B.D. Ultrahigh molecular weight polyethylene particles have a direct effect on proliferation, differentiation, and local factor production of MG63 osteoblast-like cells. **J. Orthop. Res.**, v. 17, p. 9-17, 1999.

DiCARLO, E.F. Bullough PG. The biologic responses to orthopedic implants and their wear debris. **Clin. Mater.**, v.9, p.235–260, 1992.

DINGLE, J.T.; PAGE THOMAS, D.P.; KING, B. *In vivo* studies of articular tissue damage mediated by catabolin/interleukin 1. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 46, p.527-533, 1987.

DINGLE, J.T.; HORNER A.; SHIELD, M. The sensitivity of synthesis of human cartilage matrix to inhibition by IL-1 suggests a mechanism for the development of osteoarthritis. **Cell Biochem. Func.**, v. 9, p. 99-102, 1991.

DINGLE, J.T.; LEEMING, M.R.G.; MARTINDALE, J.J. Effect of tenidap on cartilage integrity *in vitro*. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 52, p. 292-299, 1993.

DOEHRING, T.C.; SAIGAL, S.; SHANBHAG, A.S.; RUBASH, H.E. Micromotion of acetabular liners: measurements comparing the effectiveness of locking mechanisms. **Trans. Orthop. Res. Soc.**, v.21, p. 427, 1996.

DORR, L.D.; BLOEBAUM, R.; EMMANUAL, J.; MELDRUM, R. Histologic, biochemical and ion analysis of tissue and fluids retrieved during total hip arthroplasty. **Clin. Orthop.**, v. 261, p. 82-95, 1990.

ERA, T. A study on the effects of particulate metals of orthopaedic interest on murine macrophages *in vitro*. **J. Bone Joint Surg.**, v. 57B, p.444-450, 1975.

ERA, T. The biological response to titanium and titanium-aluminumvanadium alloy particles I. Tissue culture studies. **Biomaterials**, v. 7, p. 30-36, 1986.

EVANS, E.M.; FREEMAN, M.A.R.; MILLER, A.J.; VERNON-ROBERTS, B. Metal sensitivity as a cause of bone necrosis and loosening of the prosthesis in total joint replacement. **J. Bone Joint Surg.**, v.56B, p.626-642, 1974.

FERNANDES, J.C.; MARTEL-PELLETIER, J.; JOVANOVIC, D.; TYARDIF, G.; DIBATTISTA, J.A.; LASCAU-COMAN, V.; OTTERNESS, I.G.; PELLETIER, J.P. Effects of tenidap on canine experimental osteoarthritis: II Study of the expression of collagenase-I and IL-1 β by *in situ* hybridization. **J. Rheumatol.**, v. 25, p. 951-958, 1998.

FOWLER, P.D.; SHADFORTH, M.F.; CROOK, P.R. et al. Plasma and synovial fluid concentrations of diclofenac sodium and its major hydroxylated metabolites during long term treatment of rheumoid arthritis. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, v. 25, p. 389-394, 1983.

FOREST, M.; CARLIOZ, A.; VACHER LAVENU, M.C.; POSTEL, M.; KERBOULL, M.; TOMENO, B.; COURPIED, J.P. Histological patterns of bone and articular tissues after orthopaedic reconstructive surgery (artificial joint implants). **Pathol. Res. Pract.**, v.187, p. 963-977, 1991.

FRIEDMAN, R.J.; BLACK, J.; GALANTE, J.O.; JACOBS, J.J.; SKINNER, H.B. Current concepts in orthopaedic biomaterials and implant fixation. **J. Bone Joint. Surg.**, v. 75^A, p. 1086-1109, 1993.

FULLER, K.; MURPHY, C.; KIRSTEIN, B.; FOX, S.W.; CHAMBERS, T.J. TNF-alpha potently activates osteoclasts, through a direct action independent of and strongly synergistic with RANKL. **Endocrinology**, v. 143, n. 3, p.1108-1118, 2002

GARRETT, R.; WILKSCH, J.; VERNON-ROBERTS, B. Effects of cobalt-chrome alloy wear particles on the morphology, viability and phagocytic activity of murine macrophages in vitro. **Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.**, v. 61, n. 3, p. 355–369, 1983.

GELB, H.; SCHUMACHER, H.R.; CUCKLER, J.; BAKER, D.G. In vivo inflammatory response to polymethylmethacrylate particulate debris: Effect of size, morphology, and surface area. **J. Orthop. Res.**, v.12, p. 83–92, 1994.

GILBERT, J.L.; BUCKLEY, C.A.; JACOBS, J.J. In vivo corrosion of modular hip prosthesis components in similar metal combinations. The effect of crevice, stress, motion and alloy coupling. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 27, p. 1533–1544, 1993.

GLANT, T.T.; JACOBS, J.J.; MOLNÁR, G.; SHANBHAG, A.S.; VALYON, M.; GALANTE, J.O. Bone resorption activity of particulate-stimulated macrophages. **J. Bone Miner Res.**, v. 8, p. 1071–1079, 1993.

GLANT, T.T.; VALYON, M.; MIKECZ, K.; COLE, A.; JACOBS, J.J.; YAO, J.; KUETTNER, K.E. Discoordinate expression of IL-1 α and IL-1 in interfacial membranes of failed joint prostheses. **Agents Actions**, Special Conference Issue, v. 4, n. 41, p.C172–C173, 1994.

GLANT, T.T.; JACOBS, J.J. Response of three murine macrophage populations to particulate debris: bone resorption in organ cultures. **J. Orthop. Res.**, v. 12, p. 720–731, 1994b.

GOATER, J.J.; O'KEEFE, R.J.; ROSIER, R.N.; PUZAS, J.E.; SCHWARZ, E.M. Efficacy of ex vivo OPG gene therapy in preventing wear debris induced osteolysis. **J. Orthop. Res.**, v. 20, n. 2, p. 169–173, 2002

GOLDRING, S.R.; SCHILLER, A.L.; ROELKE, M.; ROURKE, C.M.; O'NEILL, D.A.; HARRIS, W.H. The synovial-like membrane at the bone-cement interface in loose total hip replacements and its proposed role in bone lysis. **J. Bone Joint. Surg.**, v. 65^A, p. 575–584, 1983.

GOLDRING, S.R.; JASTY, M.J.; ROELKE, M.S.; ROURKE, C.M.; BRINGHURST, F.R.; HARRIS, W.H. Formation of a synovial-like membrane at the bone-cement interface. Its role in bone resorption and implant loosening after total hip replacement. **Arthritis Rheum.**, v. 29, p. 836–841, 1986.

GOODMAN, S.B.; CHIN, R.C.; CHIOU, S.S.; SCHURMAN, D.J.; WOOLSON, S.T.; MASADA, M.P. A clinical-pathologic-biochemical study of the membrane surrounding loosened and nonloosened total hip arthroplasties. **Clin. Orthop.**, v. 244, p.182–187, 1989

GOODMAN, S.B.; ASPENBERG, P.; SONG, Y.; KNOBLICH, G.; HUIE, P.; REGULA, D.; LIDGREN, L. Tissue ingrowth and differentiation in the bone-harvest chamber in the

presence of cobalt-chromium-alloy and high-density-polyethylene particles. **J. Bone Joint Surg.**, v. 77^A, p. 1025–1035, 1996

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISSHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. **Anal Biochem.**, v. 126, p. 131–138, 1982.

GRUEN, T.A.; MCNEICE, G.M.; AMSTUTZ, H.C. "Modes of failure" of cemented stem-type femoral components. **Clin Orthop.**, v. 141, p.17–27, 1979.

HARAOUI, B.; PELLETIER, J.P.; MARTEL-PELLETIER, J. Synovial membrane histology and immunopathology in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: *in vivo* effects of antirheumatic drugs. **Arthritis Rheum.**, v. 34, p.153–163, 1991.

HARRIS, W.J.; SCHILLER, A.L.; SCHOLLER, J.M.; FREIBERG, R.A.; SCOTT, R. Extensive localized bone resorption in the femur following total hip replacement. **J. Bone Joint Surg.**, v. 58^A, p. 612–618, 1976.

HARRIS, W.J.; DAVIES, J.P. Modern use of modern cement for total hip replacement. **Orthop. Clin. North Am.**, v. 19, p.581–589, 1988.

HARRIS, W.J.; MCGANN, W.A. Loosening of the femoral component after use of the medullary-plug cementing technique. **J. Bone Joint Surg.**, v.68^A, p.1064–1066, 1986.

HAYASHI, T.; INOUE, H. Tissue reaction around loosened prostheses: a histological, x-ray microanalytic and immunological study. **Acta Med. Okayama**, v. 40, p.229–241, 1986.

HAYNES, D.R.; ROGERS, S.D.; HAY, S.; APP, B.; PEARCY, M.J.; HOWIE, D.W. The differences in toxicity and release of bone-resorbing mediators induced by titanium and cobalt-chromium-alloy wear particles. **J. Bone Joint Surg.**, v.75^A, p.825–834, 1993.

HE, C.; WILHELM, S.M.; PENTLAND, A.P.; MARMER, B.L.; GRANT, G.A.; EISEN, A.Z.; GOLDBERG, G.I. Tissue cooperation in a proteolytic cascade activating human interstitial collagenase. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**, v. 86, p.2632–2635, 1989.

HORIKOSHI, M.; DOWD, J.; MALONEY, W.J.; CROSSETT, L.; RUBASH, H.E. Activation of human fibroblasts and macrophages by particulate wear debris from failed total hip and total knee arthroplasty **Trans. Orthop. Res. Soc.**, v.19, p.199, 1994.

HOROWITZ, S.M.; FRONDOZA, C.G.; LENNOX, D.W. Effects of polymethylmethacrylate exposure upon macrophages. **J. Orthop. Res.**, v. 6, p.827–832, 1988.

HOROWITZ, S.M.; GAUTSCH, T.L.; FRONDOZA, C.G.; RILEY, L.J.R. Macrophage exposure to polymethylmethacrylate leads to mediator release and injury. **J. Orthop. Res.**, v. 9, p.406–413, 1991.

HOROWITZ, S.M.; DOTY, S.B.; LANE, J.M.; BURSTEIN, A.H. Studies of the mechanism by which the mechanical failure of polymethylmethacrylate leads to bone resorption. **J. Bone Joint Surg.**, v. 75^A, p. 802–813, 1993.

KIM, K.J.; CHIBA, J.; RUBASH, H.E. In vivo and in vitro analysis of membranes from hip prostheses inserted without cement. **J. Bone Joint Surg.**, v.76^A, p.172–180, 1994.

KOZAWA, O.; SUZUKI, A.; TOKUDA, H.; KAIDA, T.; UEMATSU, T. Interleukin-6 synthesis induced by prostaglandin E2: cross-talk regulation by protein kinase C. **Bone**, Apr., v. 22, n. 4, p. 355-60, 1998.

KRASKA, A.R.; WILHEM, F.E.; KIRBY, D.S.; LOOSE, L.D.; TING, N.; SHANAHAN, W.R.; WEINER, E.S. Tenidap vs piroxicam vs piroxicam plus hydroxychloroquine in rheumatoid arthritis (abstract). **Arthritis Rheum.**, (suppl) 36, p. S57, 1993.

LALOR, P.A.; REVELL, P.A.; GRAY, A.B.; WRIGHT, S.; RAILTON, G.T.; FREEMAN, M.A.R. Sensitivity to titanium (A cause of implant failure?). **J. Bone Joint Surg.**, v.73B, p. 25–28, 1991.

LEE, S.H.; BRENNAN, F.R.; JACOBS, J.J.; URBAN, R.M.; RAGASA, D.R.; GLANT, T.T. Human monocyte/macrophage response to particulate wear debris: Sensitization of macrophages to cobalt-chromium corrosion products and titanium in patients with total joint replacements. **J. Orthop. Res.**, v. 15, p. 40–49, 1997.

LITTMAN, B.H.; DRURY, C.E.; STEWART, C.R. Acute phase protein and plasma IL-6 in patients with rheumatoid arthritis: Effects of tenidap and piroxicam in a 12 week double blind crossover study (abstract). **Arthritis Rheum.**, (suppl) 36, p.S-112, 1993.

MACAULAY, W.; SHANBHAG, A.S.; MARINELLI, R.; STEFANOVIC-RACIC, M.; RUBASH, H.E.; WOO, S.-Y. Nitric oxide release from murine macrophages when stimulated with particulate debris. **Trans. Soc. Biomater.**, v. 18, p. 307, 1995.

MACAULAY, W.; HASSELMAN, C.T.; SHANBHAG, A.S.; DOWD, J.E.; WOEL, S.; RUBASH, H.E. Bone ingrowth and particulate debris in a canine acetabular arthroplasty model. **Trans. Orthop. Res. Soc.**, v. 21, p. 93, 1996.

MALONEY, W.J.; JASTY, M.J.; HARRIS, W.J.; GALANTE, J.O.; CALLAGHAN, J.J. Endosteal erosion in association with stable uncemented femoral components. **J. Bone Joint Surg.**, v. 72^A, p. 1025–1034, 1990.

MALONEY, W.J.; ENGH, C.A.; CHANDLER, H. Severe osteolysis of the pelvis in association with acetabular replacement without cement. **J. Bone Joint Surg.**, v. 75^A, p. 1627–1635, 1993.

MALONEY, W.J.; SMITH, R.L.; SCHMALZRIED, T.P.; CHIBA, J.; HUENE, D.; RUBASH, H.E. Isolation and characterization of wear particles generated in patients who have had failure of a hip arthroplasty without cement. **J. Bone Joint Surg.**, v. 77^A, p.1301–1310, 1995.

MANKIN, H.S.; BRANDT, K.D. Biochemistry and metabolism of cartilage in osteoarthritis. *In Osteoarthritis: Diagnosis and Management*. Edited by Moskowitz RW, Howell DS, Goldberg VM, et al. Philadelphia, WB Saunders, 1992, p. 109-154.

MARGEVICIUS, K.J.; BAUER, T.W.; MCMAHON, J.T.; BROWN, S.A.; MERRITT, K. Isolation and characterization of debris in membranes around total joint prostheses. **J. Bone Joint Surg.**, v.76^A, p.1664–1675, 1994.

MARTEL-PELLETIER, J.; CLOUTIER, J.M.; PELLETIER, J.P. Cathepsin B and cysteine protease inhibitors in human osteoarthritis. **J. Orthop. Res.**, v. 8, p.336-344, 1990a.

MARTEL-PELLETIER, J.; CLOUTIER, J.M.; PELLETIER, J.P. Cytokines, interleukin-1 and the tumor necrosis factor in human osteoarthritic tissues. **Trans. Orthop. Res. Soc.**, v. 15, p. 111, 1990b.

MARTEL-PELLETIER, J.; ZAFARULLAH, M.; KODAMA, S.; PELLETIER, J.P. *In vitro* effects of IL-1 on the synthesis of metalloproteases, TIMP, plasminogen activators and inhibitors in human articular cartilage. **J. Rheumatol.**, v. 18, p. 80-84, 1991.

MARTEL-PELLETIER, J.; MCCOLLUM, R.; DiBAPTISTA, J.; PELLETIER, J.P. The interleukin-1 receptor in normal and osteoarthritic human articular chondrocytes. Identification as the type I receptor and analysis of binding kinetics and biologic function. **Arthritis Rheum.**, v. 35, p. 530-540, 1992.

MERRITT, K.; BROWN, S.A. Hypersensitivity to metallic biomaterials. In: Williams DF, ed. **Systemic aspects of biocompatibility**, vol. II. Boca Raton, FL: CRC Press, 1981, p. 33–48.

MERCHANT, K.K.; ROHR, W.L.; LINTNER, W.P.; BHAMBRI, S.K. Orthopaedic implant surface debris. **Trans. Orthop. Res. Soc.**, v. 20, p.164, 1995.

MEVELLEC, C.; BURLEIGH, T.D.; SHANBHAG, A.S. Corrosion in modular femoral hip prostheses: a study of 22 retrieved implants. **Proceedings of the 15th Southern Biomedical Engineering Conference**, Dayton, OH, v. 29, n.31, p. 3–4, 1996.

MILLET, PJ; ALLEN, MJ; BOSTROM, MP:Effects of alendronate on particle-induced osteolysis in a rat model. **J Bone Joint Surg Am** Feb;84-A(2):236-49, 2002

MIRRA JM, AMSTUTZ HC, MATOS M, GOLD R. The pathology of the joint tissues and its clinical relevance in prosthesis failure. **Clin Orthop**;117:221–240. 1976

MIRRA JM, MARDER RA, AMSTUTZ HC. The pathology of failed total joint arthroplasty. **Clin Orthop**;170:175–183. 1982

MOCHAN, E; KELER, T. Plasmin degradation of cartilage proteoglycan. **Biochim Biophys Acta** 800:312-315, 1984.

MOHLER, C.G.; KULL, L.R.; MARTELL, J.M.; ROSENBERG, A.G.; GALANTE, J.O. Total hip replacement with insertion of an acetabular component without cement and a femoral component with cement. **J. Bone Joint. Surg.**, v.77^A, p. 86–96, 1995.

MULROY JR., R.D.; HARRIS, W.J. The effect of improved cementing techniques on component loosening in total hip replacement. **J. Bone Joint Surg.**, v.72B, p.757–760, 1990.

MURRAY, D.W.; RUSHTON, N. Macrophages stimulate bone resorption when they phagocytose particles. **J. Bone Joint Surg.**, v. 72B, p. 988-992, 1990.

MURPHY, G.; COCKETT, M.I.; STEPHENS, P.E. Stromelysin is an activator of procollagenase. A study with natural and recombinant enzymes. **Biochem J.**, v. 248, p. 265-268, 1987.

National Institutes of Health. Total hip replacement. Bethesda, MD: **NIH Consensus Statement**, v. 12, n. 5, p. 1-31, 1994.

O'NEILL, D.A.; HARRIS, W.J. Failed total hip replacement: assessment by plain radiographs, arthrograms, and aspiration of the hip joint. **J. Bone Joint Surg.**, v. 66^A, p. 540-546, 1986.

OTTERNES, I.G.; BLIVEN, M.L.; DOWN, J.T.; NATOLI, E.J.; HANSON, D.C. Inhibition of interleukin 1 synthesis by tenidap: A new drug for arthritis. **Cytokine**, v. 3, p. 227-283, 1991.

OUNISSI-BERKALHA, H.; PELLETIER, J.P.; TARDIF, G.; MINEAU, F.; JOLICOEUR, F.C.; RANGER, P.; MARTEL-PELLETIER, J. *In vitro* effects of 2 antirheumatic drugs on the synthesis and expression of proinflammatory cytokines in synovial membranes from patients with rheumatoid arthritis. **J. Rheumatol.**, v. 23, p. 16-23, 1996.

PELLETIER, J.P.; MARTEL-PELLETIER, J. Evidence for the involvement of interleukin 1 in human osteoarthritic cartilage degradation: protective effect of NSAID. **J. Rheumatol.**, v. 16, p. 19-27, 1989a.

PELLETIER, J.P.; McCOLLUM, R.; DiBATTISTA, J.; LOOSE, L.D.; CLOUTIER, J.M.; MARTEL-PELLETIER, J. Regulation of human normal and osteoarthritic chondrocyte interleukin-1 receptor by antirheumatic drugs. **Arthritis Rheum.**, v. 36, p. 1517-1527, 1993a.

PELLETIER, J.P.; DiBATTISTA, J.; ROUGHLEY, P.R.; MARTEL-PELLETIER, J. Cytokines and inflammation in cartilage degradation. *In Osteoarthritis*, Edition of Rheumatic Disease Clinics of North America. Edited by RW Moskowitz. Philadelphia, W.B Saunders Company Publishers, 1993b, p.545-568.

PARK, J.B. Method of orthopedic implantation and implant product. **United States Patent**, n. 4, p. 491-987, 1985.

PARK, J.B.; VON RECUM, A.F.; GRATZICK, G.E. Pre-coated orthopedic implants with bone cement. **Biomater Med. Devices Artif. Organs.**, v. 7, p. 41-53, 1979.

POLLICE, P.F.; ROSIER, R.N.; LOONEY, R.J.; PUZAS, J.E.; SCHWARZ, E.M.; O'KEEFE, R.J. Oral pentoxifylline inhibits release of tumor necrosis factor-alpha from human peripheral blood monocytes : a potential treatment for aseptic loosening of total joint components. **J. Bone Joint Surg.**, v. 83-A, n. 7, p.1057-1061, 2001.

QIN, S.; LAJEUNESSE, D.; REBOUL, P.; MARTEL-PELLETIER, J.; DEHNADE, F.; PELLETIER, J.P.; FERNANDES, J.C. Metabolic activity of osteoblasts from periprosthetic

trabecular bone in failed total hip arthroplasties and osteoarthritis as markers of osteolysis and loosening. (in press, **J. Rheumatol.**), 2002

RALSTON, S.H.; HO, L.P.; HELFRICH, M.H.; GRABOWSKI, P.S.; JOHNSTON, P.W.; BENJAMIN, N. Nitric oxide: a cytokine-induced regulator of bone resorption. **J. Bone Miner Res.**, v. 10, n. 7, p. 1040-1049, 1995.

RALSTON, S.H.; GRABOWSKI, P.S. Mechanisms of cytokine induced bone resorption: role of nitric oxide, cyclic guanosine monophosphate, and prostaglandins. **Bone**, v. 19, n. 1, p. 29-33, 1996.

RATCLIFFE, A.; AZZO, W.; SAED-NEJAD, F.; LANE, N.; ROSENWASSER, M.P.; MOW, W.C. *In vivo* effects of naproxen on composition proteoglycan metabolism, and matrix metalloproteinase activities in canine articular cartilage. **J. Orthop. Res.**, v.11, p.163-171, 1993.

REVELL, P.A.; MAYSTON, V.; LALOR, P.; MAPP, P. The synovial membrane in osteoarthritis: A histological study including the characterization of the cellular infiltrate present in inflammatory osteoarthritis using monoclonal antibodies. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 47, p. 300-307, 1988.

ROOKER, G.D.; WILKINSON, J.D. Metal sensitivity in patients undergoing hip replacement. **J. Bone Joint Surg.**, v.62B, p. 502-505, 1980.

ROSEMBERG, L. Structure and function of proteoglycans. *In Arthritis and Allied Conditions*. Edited by McCarty DJ, Philadelphia, Lea & Febiger, 1989, p. 240-255.

RUBASH, H.E.; HARRIS, W.J. Revision of nonseptic, loose, cemented femoral components using modern cementing techniques. **J. Arthroplasty**, v. 3, p. 241-248, 1988.

SANTAVIRTA, S.; KONTTINEN, Y.T.; BERGROTH, V.; ESKOLA, A.; TALLROTH, K.; LINDHOLM, I.S. Aggressive granulomatous lesions associated with hip arthroplasty. **J. Bone Joint Surg.**, v.72^A, p.252-258, 1990.

SANTAVIRTA, S.; KONTTINEN, Y.T.; HOIKKA, V.; ESKOLA, A. Immunopathological response to loose cementless acetabular components. **J. Bone Joint Surg.**, v.73B, p.38-42, 1991.

SABOKBAR, A.; FUJIKAWA, Y.; NEALE, S.; MURRAY, D.W.; ATHANASOU, N.A. Human arthroplasty derived macrophages differentiate into osteoclastic bone resorbing cells. **Ann Rheum. Dis.**, v.56, p. 414-420, 1997.

SCHINDLER, R.; MANCILLA, J.; ENDRES, S.; GHORBANI, R.; CLARKE, S.C.; DINARELLO, C.A. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1 and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. **Blood**, v.75, p.40-47, 1990.

SHANBHAG, A.S.; JACOBS, J.J.; BLACK, J.; GALANTE, J.O.; GLANT, T.T. Cellular mediators secreted by interfacial membranes obtained at revision total hip arthroplasties. **J Arthroplasty**, v.10, p. 498-506, 1995.

SHANBHAG, A.S.; JACOBS, J.J.; BLACK, J.; GALANTE, J.O.; GLANT, T.T. Human monocyte response to particulate biomaterials generated in-vivo and in-vitro. **J.Orthop. Res.**, v.13, p.792–801, 1995b.

SHANBHAG, A.S.; RUBASH, H.E. Wear: the basis of particle disease in total hip arthroplasty. **Tech. Orthop.**, v. 8, p.269–274, 1994.

SHANBHAG, A.S.; JACOBS, J.J.; GLANT, T.T.; GILBERT, J.L.; BLACK, J.; GALANTE, J.O. Composition and morphology of wear debris in failed uncemented total hip replacement arthroplasty. **J. Bone Joint Surg.**, v.76B, p.60–67, 1994b.

SHANBHAG, A.S.; JACOBS, J.J.; BLACK, J.; GALANTE, J.O.; GLANT, T.T. Macrophage/particle interactions: effect of size, composition and surface area. **J. Biomed. Mater Res.**, v. 28, p. 81–90, 1994c.

SHANBHAG, A.S.; BAILEY, H.O.; HWANG, D.S.; EROR, N.G.; WOO, S.L.Y.; RUBASH, H.E. Chemical and morphological characterization of wear debris associated with acetabular screw holes. **Trans. Soc. Biomater.**, v.18, p. 325, 1995.

SHANBHAG, A.S.; BAILEY, H.O.; EROR, N.G.; WOO, S.L.Y.; RUBASH, H.E. Characterization and comparison of UHMWPE wear debris retrieved from total hip and total knee arthroplasties. **Trans. Orthop. Res. Soc.**, v. 21, p. 467, 1996.

SHANBHAG, A.S.; HASSELMANN, C.T.; RUBASH, H.E. The John Charnley Award. Inhibition of wear debris mediated osteolysis in a canine total hip arthroplasty model. **Clin. Orthop.**, v. 344, p. 33–43, 1997.

SHANBHAG, A.S.; JACOBS, J.J.; BLACK, J.; GALANTE, J.O.; GLANT, T.T. Effects of particles on fibroblast proliferation and bone resorption in vitro. **Clin. Orthop.**, v.342, p. 205–217, 1997b.

SCHMALZRIED, T.P.; JASTY, M.J.; HARRIS, W.J. Periprosthetic bone loss in total hip arthroplasty. **J. Bone Joint Surg.**, v. 74^A, p. 849–863, 1992.

SCHWARZ, E.M.; LU, A.P.; GOATER, J.J.; BENZ, E.B.; KOLLIAS, G.; ROSIER, R.N.; PUZAS, J.E.; O'KEEFE, R.J. Tumor necrosis factor- α /nuclear transcription factor- κ B signaling in periprosthetic osteolysis. **J. Orthop. Res.**, v. 18, n. 3, p. 472–480, 2000.

SINHA, R.K.; MALONEY, W.J.; PAPROSKY, W.G.; RUBASH, H.E. Surgical treatment of osteolysis. In **The adult hip**. Edited by Calagham JJ, Rosemberg AG, Rubash HE. Lippincott-Raven, Philadelphia, 1998, p. 1549–1554.

SMITH, D.M.; JOHNSON, J.A.; LOESER, R.; TURNER, R.A. Evaluation of Tenidap (CP-66,248) on human neutrophil arachidonic acid metabolism, chemotactic potential and clinical efficacy in the treatment of rheumatoid arthritis. **Agents Actions** v. 31, n.1/2, p. 102–109, 1990.

STAUFFER, R.N. Ten-year follow-up study of total hip replacement. **J. Bone Joint Surg.**, v. 64^A, p. 983–990, 1982.

SUDA, T.; NAKAMURA, I.; JIMI, E.; TAKAHASHI, N. Regulation of osteoclast function. **J. Bone Min. Res.**, v. 12, p. 869–879, 1997.

TANZER, M.; MALONEY, W.J.; JASTY, M.J.; HARRIS, W.J. The progression of femoral cortical osteolysis in association with total hip arthroplasty without cement. **J. Bone Joint Surg.**, v. 74^A, p. 404–410, 1992.

THORNHILL, T.S.; OZUNA, R.M.; SHORTKROFF, S.; KELLER, K.; SLEDGE, C.B.; SPECTOR, M. Biochemical and histological evaluation of the synovial-like tissue around failed (loose) total joint replacement prostheses in human subjects and a canine model. **Biomaterials**, v. 11, p. 69–72, 1990.

TODD, P.A.; SORKIN, E.M. Diclofenac Sodium. A reappraisal of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy. **Drugs**, v. 35, p. 244–285, 1988.

URBAN, R.M.; JACOBS, J.J.; GILBERT, J.L.; GALANTE, J.O. Migration of corrosion products from modular hip prostheses. **Clin. Orthop.**, v. 76^A, p. 1345–1359, 1994.

URBAN, R.M.; JACOBS, J.J.; SAPIENZA, C.I.; HALL, D.J.; INFANGER, S.; SUMNER, D.R.; BERZINS, A.; TURNER, T.M.; GALANTE, J.O. Interface tissues and modes of particulate debris infiltration in 25 cementless acetabular components retrieved at autopsy. **Trans. Orthop. Res. Soc.**, v. 21, p. 45, 1996.

VARGAS, S.J.; NAPRTA, A.; GLACCUM, M.; LEE, S.K.; KALINOWSKI, J.; LORENZO, J.A. Interleukin-6 expression and histomorphometry of bones from mice deficient in receptors for interleukin-1 or tumor necrosis factor. **J. Bone Min. Res.**, v. 17, p. 44, 1996.

VERNON-ROBERTS, B.; FREEMAN, M.A.R. Morphological and analytical studies of the tissues adjacent to joint prostheses: investigations into the causes of loosening prostheses. In: Schaldach M, Hohmann D, eds. **Advances in artificial hip and knee joint technology**. Berlin: Springer-Verlag, 1976, p. 148–186.

VERNON-ROBERTS, B.; FREEMAN, M.A.R. The tissue response to total joint replacement prostheses. In: Swanson SAV, Freeman MAR, eds. **The scientific basis of joint replacement**. New York: John Wiley & Sons, 1977, 86–129.

WALLIS, W.J.; SIMKIN, P.A. Antirheumatic drug levels in human synovial fluid and synovial tissue. Observations on extravascular pharmacokinetics. **Clin. Pharmacokinet**, v. 8, p. 496–522, 1983.

WILLERT, H.G.; LUDWIG, J.; SEMLITSCH, M. Reaction of bone to methacrylate after hip arthroplasty. **J. Bone Joint Surg.**, v. 56^A, p. 1368–1382, 1974.

WILLERT, H.G.; SEMLITSCH, M. Tissue reactions to plastic and metallic wear products of joint endoprostheses. In: Geschwind N, Debrunner HU, eds. **Total hip prosthesis**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1976, p. 205–239.

WILLERT, H.G. SEMLITSCH M. Reactions of the articular capsule to wear products of artificial joint prostheses. **J. Biomed. Mater Res.**, v.11, p. 157–164, 1977.

WILLERT, H.G.; BERTRAM, H.; BUCHHORN, G.H. Osteolysis in alloarthroplasty of the hip. The role of bone cement fragmentation. **Clin. Orthop.**, v. 258, p. 108–121, 1990.

WILLERT, H.G.; BERTRAM, H.; BUCHHORN, G.H. Osteolysis in alloarthroplasty of the hip. The role of ultra-high molecular weight polyethylene wear particles. **Clin. Orthop.**, v. 258, p. 95–107, 1992.

WROBLEWIKI, B.M. Charnley low-friction arthroplasty, Review of past, present status and prospects for the future. **Clin. Orthop.**, v. 210, p. 37–42, 1986.

ZHANG, X.; MORHAM, S.G.; LANGENBACH, R.; YOUNG, D.A.; XING, L.; BOYCE, B.F.; PUZAS, E.J.; ROSIER, R.N.; O'KEEFE, R.J.; SCHWARZ, E.M. Evidence for a direct role of cyclo-oxygenase 2 in implant wear debris-induced osteolysis. **J. Bone Miner Res.**, v. 16, n. 4, p. 660–670, 2001.

ZAMBONIN, G.; COLUCCI, S.; CANTATORE, F.; GRANO, M. Response of human osteoblasts to polymethylmetacrylate in vitro. **Calc. Tissue Int.**, v. 62, p. 362–365, 1998.

YAO, J.; GLANT, T.T.; LARK, M.W.; MIKECZ, K.; JACOBS, J.J.; HUTCHINSON, N.I.; HOERRNER, L.A.; KUETTNER, K.E.; GALANTE, J.O. The potential role of fibroblasts in periprosthetic osteolysis: fibroblast response to titanium particles. **J. Bone Miner Res.**, v. 10, p. 1417–1427, 1995.

YAO, J.; CS-SZABO, G.; JACOBS, J.J.; KUETTNER, E.K.; GLANT, T.T. Suppressed osteoblast function may contribute to periprosthetic osteolysis: defect of collagen synthesis in osteoblast-like cells exposed to particulate debris. **J. Bone Joint Surg. Am.**, v. 79, n. 1, p. 107–112, 1997.